

Evaluation der Wertigkeit von Serum Amyloid Alpha und Transthyretin als Biomarker für Nierenzellkarzinome

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät

der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Christopher Georgi

geboren am 31.05.1984 in Worms

Gutachter

- 1. PD Dr. med. habil. Kerstin Junker, Jena**
- 2. Prof. Dr. med. habil. Utz Settmacher, Jena**
- 3. Prof. Dr. med. habil. Andres Jan Schrader, Ulm**

Tag der öffentlichen Verteidigung: 01.02.2011

Abkürzungsverzeichnis

AJCC	- American Joint Committee on Cancer
AP	- alkalische Phosphatase
AWMF	- Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften
BMI	- Body Mass Index
CT	- Computertomographie
ELISA	- Enzyme-linked-immunosorbent-assay
ECOG	- Eastern Cooperative Oncology Group
HDL	- High density lipoproteine
HR	- Hazard Ratio
HRP	- Streptavidin-Peroxidase
INF-alpha	- Interferon alpha
IL-2	- Interleukin 2
mRNA	- Messenger Ribonucleotidacid
MRT	- Magnetresonanztomographie
mTOR	- Mamillian Target of Rapamycin
NTX	- Nierentransplantation
NZK	- Nierenzellkarzinom
ROC	- Receiver operating curve
SAA	- Serum Amyloid Alpha
SDB	- Standard Diluent Buffer
SELDI-TOF-MS	- Surface enhanced laser desorption/ionization- time of flight- mass spectrometry
TMB	- Tetramethylbenzidin
TTR	- Transthyretin
UICC	- Union International contre le cancer
VHL	- Von Hippel Lindau

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	2
Zusammenfassung	6
I. Einleitung	8
1. Vorwort	8
2. Allgemeiner Teil	8
2.1. Epidemiologie	8
2.2. Ätiologie	9
2.3. TNM-Klassifikation der UICC 2002	11
2.4. Histologische Einteilung der epithelialen Nierentumoren	12
2.5. Diagnose	12
2.6. Therapie	13
2.6.1. lokalisiertes Nierenzellkarzinom	13
2.6.2. fortgeschrittenes Nierenzellkarzinom	13
2.6.2.1. Immuntherapie	13
2.6.2.2. Targeted Therapy	14
2.7. genetische Veränderungen	16
2.7.1. Klarzelliger Typ	16
2.7.2. Papillärer Typ	16
2.7.3. Chromophober Typ	16
2.7.4. Onkozytome	17
2.8. Tumormarker	17
2.9. Serum Amyloid Alpha	17
2.10. Transthyretin	18
II. Zielstellung	19
III. Material und Methode	20
1. Patientengut	20
2. Methodik	23
2.1. Probengewinnung	23
2.2. ELISA	24
2.2.1. Grundlagen der ELISA-Technik	24
2.2.2. Messverfahren	25
2.2.2.1. SAA-ELISA	25

2.2.2.1.1. Verdünnung der Serumproben	25
2.2.2.1.2. Verdünnung des Standards	26
2.2.2.1.3. Verdünnung des Streptavidin-HRP	26
2.2.2.1.4. Verdünnung des Waschpuffers	26
2.2.2.1.5. Messung	27
2.2.2.2. Transthyretin-ELISA	27
2.2.2.2.1. Verdünnung der Serumproben	27
2.2.2.2.2. Herstellung des Standards	28
2.2.2.2.3. Verdünnung des Konjugats	28
2.2.2.2.4. Verdünnung des Waschpuffers	28
2.2.2.2.5. Messung	28
3. Statistische Auswertung (SPSS)	29
IV. Ergebnisse	30
1. Nierenzellkarzinome	30
1.1. Serum Amyloid Alpha	30
1.1.1. Korrelation zu pT-Kategorie und Malignitätsgrad	32
1.2. Transthyretin	34
1.2.1. Korrelation zu pT-Kategorie und Malignitätsgrad	36
2. Metastasierte Nierenzellkarzinome	38
2.1. Serum Amyloid Alpha	38
2.1.1. Korrelation zu pT-Kategorie und Malignitätsgrad	42
2.2. Transthyretin	43
2.2.1. Korrelation zu pT-Kategorie und Malignitätsgrad	48
2.3. Serum Amyloid Alpha und Transthyretin beim klarzelligen Nierenzellkarzinom unter Berücksichtigung der Metastasierung	49
3. Serum Amyloid Alpha im postoperativen Verlauf nach Tumornephrektomie	50
4. Serum Amyloid Alpha bei Harnblasenkarzinomen	55
5. Nierentransplantation	58
5.1. Serum Amyloid Alpha	58
5.2. Transthyretin	59

V. Diskussion	60
1. Nierenzellkarzinom	60
1.1. Serum Amyloid Alpha als Biomarker für Nierenzellkarzinome	60
1.2. Transthyretin als Biomarker für Nierenzellkarzinome	63
1.3. Nutzen der Kombination aus Serum Amyloid Alpha und Transthyretin als Biomarker für Nierenzellkarzinome	65
2. Serum Amyloid Alpha als Biomarker bei Patienten nach Tumornephrektomie	67
3. Serum Amyloid Alpha als Biomarker bei Harnblasentumoren	69
4. Nierentransplantation	69
4.1. Serum Amyloid Alpha als Prädiktor einer Abstoßungsreaktion bei Nierentransplantationen	69
4.2. Transthyretin als Prädiktor einer Abstoßungsreaktion bei Nierentransplantationen	70
VI. Schlussfolgerung	72
Literaturverzeichnis	74
Anhang	82

Zusammenfassung

Bei Männern stellt das NZK die sechst häufigste Krebstodesursache dar. Dies ist, obgleich eines relativ niedrigen Anteils von ca. 3% an allen Krebserkrankungen, vor allem mit der frühzeitigen Metastasierung zu erklären, die in einem Drittel der Fälle bereits im asymptomatischen Zustand erfolgt ist. Die 5-Jahresüberlebensrate wird dann mit ca. 10% angegeben. Da es sich bei den NZK um eine heterogene Gruppe von Tumoren mit unterschiedlichem Metastasierungsrisiko handelt, muss eine individuelle Therapie das Ziel sein. Derzeit sind noch keine Biomarker verfügbar, die durch eine Risikoabschätzung den gezielten und frühzeitigen Einsatz neuer Medikamente wie Thyrosinkinaseinhibitoren und monoklonaler Antikörper ermöglichen. Durch die vorangegangenen SELDI-TOF-MS-Analysen konnten SAA und TTR als mögliche Biomarker ermittelt werden.

Ziel dieser Arbeit war es, deren Aussagekraft in verschiedenen Subtypen des NZK und dabei vor allem mit Blick auf deren Aggressivität sowie im Verlauf nach Tumornephrektomie zu beurteilen. Im Vergleich sollte auch die Wertigkeit bei anderen urologischen Tumoren, wie z.B. dem Harnblasenkarzinom oder bei anderen Erkrankungen der Niere wie z.B. nach Nierentransplantation beurteilt werden. Die Messungen wurden dabei mit jeweils spezifischen ELISA-Kits durchgeführt.

Eine Unterscheidung der Subtypen des NZK war anhand der Konzentrationen von SAA und TTR zwar nicht möglich, allerdings konnte mit Hilfe des TTR eine Differenzierung zur Kontrollgruppe und mit Hilfe des SAA eine Differenzierung zu Onkozytomen und der Kontrollgruppe vorgenommen werden. Zudem fand sich ein positiver Zusammenhang zwischen Malignitätsgrad und lokaler Tumorausbreitung.

Die metastasierten klarzelligen NZK zeigten für das SAA stark erhöhte Werte und für das TTR erniedrigte Werte, die jeweils signifikant waren. Durch Kombination von Cut-offs, die für jedes der beiden Proteine mit ROC-Kurven bestimmt wurden, konnte ein Test entwickelt werden, für den die Sensitivität 90% und die Spezifität 53,57% betrug und damit besser war, als mit den Cut-offs der einzelnen Proteine. Bei Vergleich der Metastasierung zwischen primär und sekundär bzw. früh und spät zeigten sich sowohl für SAA als auch TTR keine signifikanten Unterschiede bei den klarzelligen NZK. Die fortgeschrittenen papillären Tumoren nahmen für das TTR Werte an, die signifikant niedriger waren, als die der lokal begrenzten Tumoren. SAA zeigte bei den papillären NZK keinen signifikanten Unterschied

zwischen lokal begrenzten und fortgeschrittenen Tumoren, wenngleich die Konzentrationsunterschiede und die Höhe der angenommenen Werte denen der klarzelligen NZK sehr ähnelten.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit decken sich mit bisherigen Beobachtungen, nach denen SAA bei NZK als Indikator für Fernmetastasen angesehen wird, sich allerdings nicht zur Früherkennung lokal begrenzter NZK eignet. In der vorliegenden Arbeit konnte dies bestätigt werden. Für TTR wurden derartige Untersuchungen in der Literatur bisher noch nicht beschrieben.

Bei Beobachtung des SAA im Verlauf nach Tumornephrektomie fiel vor allem der initiale starke Anstieg am ersten postoperativen Tag auf. Daraufhin fiel der Serumspiegel wieder ab, unterschritt aber zu keinem der drei Nachsorgetermine (erster bis dritter Monat, vierter bis siebter Monat und oberhalb des siebten Monats nach Operation) den präoperativen Wert. Vielmehr fanden sich keine signifikanten Unterschiede. Die Ergebnisse für andere Tumoren ermutigen aber zu weiteren Untersuchungen bezüglich dieser Fragestellung.

Für Blasenkarzinome konnten keine Unterschiede in der SAA-Konzentration im Vergleich mit Kontrollen gemessen werden. Somit zeigt sich, dass SAA nicht ubiquitär bei Tumoren erhöht ist. Im Bezug auf Nierentransplantationen konnten sowohl für SAA als auch TTR signifikante Unterschiede zur Kontrolle festgestellt werden. Bei einer Abstoßungsreaktion waren die SAA-Werte, jedoch nicht die TTR-Werte, zudem signifikant verändert gegenüber den Werten bei Patienten ohne Abstoßungsreaktion. Dabei konnte ein Cut-off von 104,52µg/ml bei einer Sensitivität von 69,2% und eine Spezifität von 66,7% ermittelt werden. SAA kann somit als Prädiktor einer Abstoßungsreaktion herangezogen werden, wie es auch schon in der Literatur beschrieben wurde.

Zur differenzierten quantitativen Bestimmung der verschiedenen modifizierten Formen des TTR und der Isoformen des SAA im Serum werden spezifische ELISA benötigt.

Zur besseren Abschätzung der Aggressivität der Tumoren können SAA und TTR einen Beitrag leisten, sollten aber nicht einzeln betrachtet werden, denn durch eine Kombination kann die Aussagekraft verbessert werden. Die Entwicklung eines Algorithmus' zur Risikobeurteilung mit weiteren Proteinen wäre dabei eine interessante Fragestellung und könnte helfen, die Therapie des NZK zu individualisieren und dadurch möglicherweise die Prognose und Lebensqualität von Patienten zu verbessern und Ressourcen gezielt einzusetzen.

I. Einleitung

1. Vorwort

Nierenzellkarzinome haben einen Anteil von 3% an allen malignen Erkrankungen im Erwachsenenalter mit steigender Tendenz.

Deshalb ist gerade hier eine frühzeitige Diagnosestellung richtungsweisend für den weiteren Krankheitsverlauf. Durch routinemäßigen Einsatz bildgebender Verfahren werden heute 60-70% der Nierenzellkarzinome zufällig in einem asymptomatischen Zustand entdeckt. Trotz der Entdeckung immer kleinerer Tumoren wird nach wie vor eine hohe Metastasierungsrate verzeichnet, die bei einem hohen Anteil der Patienten mit einer schlechten Prognose einhergeht. Zum jetzigen Zeitpunkt existieren keine Tumormarker, die eine frühzeitige Diagnose, Überwachung des Therapieansprechens oder Kontrolle des Krankheitsverlaufes ermöglichen. Deshalb sind neue Biomarker dringend gefordert.

Ziel dieser Arbeit ist es, die Wertigkeit von Serum Amyloid Alpha und Transthyretin auf deren diagnostische und prognostische Aussagekraft bei Patienten mit Nierenzellkarzinomen zu untersuchen.

2. Allgemeiner Teil

2.1. Epidemiologie

Jedes Jahr erkranken ca. 16.700 Menschen neu an Nierentumoren. Die Erkrankungshäufigkeit ist abhängig vom Geschlecht. So beträgt das Verhältnis zwischen Männern und Frauen 1,5:1. Ein Unterschied zeigt sich auch bei der Mortalitätsrate, die bei Männern 5,2 und bei Frauen 2,2 beträgt. Damit nehmen Nierentumoren unter den 20 häufigsten Krebstodesursachen bei männlichen Patienten den 7. Rang mit 3,7% und bei weiblichen Patienten den 9. Rang mit 2,4% ein (Batzler et al. 2008, Becker und Holzmeier 2005).

Der Anteil der Nierentumoren an allen malignen Erkrankungen im Erwachsenenalter liegt bei Männern bei 4,7% und bei Frauen bei 3,2%. 85% sind dabei auf Nierenzelltumoren zurückzuführen. Es ist vor allem ein Tumor des älteren Menschen. So ist das mittlere Erkrankungsalter beim Mann 67 Jahre und bei der Frau 71 Jahre.

Die 5-Jahresüberlebensrate liegt bei 66%. Betrachtet man allerdings unterschiedliche Krankheitsstadien, werden deutliche Unterschiede sichtbar. So beträgt sie im Stadium T1-T2 noch 80-90%, bei bereits vorhandenen Metastasen aber weniger als 10% (Batzler et al. 2008).

2.2. Ätiologie

In der Literatur findet sich eine Reihe von möglichen Risikofaktoren, die einen Einfluss auf die Entwicklung eines Nierenzellkarzinoms haben könnten. So kann als gesichert betrachtet werden, dass Rauchen das Risiko, an einem Nierenzellkarzinom zu erkranken, erhöht. Genauer betrachtet steigt das Risiko mit der Menge der täglich konsumierten Zigaretten (Hunt et al. 2005, McLaughlin et al. 1990).

Gleichzeitig kann festgehalten werden, dass sich das Risiko bei Aufgabe des Rauchens im Vergleich zu aktuellen Rauchern wieder reduziert und sich nach 20 bis 30 Jahren Nichtrauchen dem Risiko lebenslanger Nichtraucher annähert (Parker et al. 2003).

Der Einfluss von Ernährungsgewohnheiten muss differenziert betrachtet werden und ist selbst dann teilweise widersprüchlich. So gibt es Studien, die dem vermehrten Verzehr von Obst und Gemüse sowie der Nahrungsergänzung mit Vitamin C und Vitamin E in Kombination mit verschiedenen Haupt- und Spurenelementen wie Kalzium und Eisen eine protektive Rolle zusprechen (Boeing et al. 1997, Hu et al. 2003b), wohingegen eine andere Studie keinen Zusammenhang zwischen Nierenzellkarzinom und dem Obst- und Gemüsekonsum feststellen konnte (van Dijk et al. 2005). Weiterhin berichten Studien über ein erhöhtes Risiko beim übermäßigen Verzehr von Fleisch bzw. fettreicher Nahrung, im Speziellen seinen dies Streichfette und Soßen (Boeing et al. 1997), Hamburger und Würstchen (Hu et al. 2003b), sowie Rindfleisch (Maclure und Willett 1990).

Zur Frage, inwieweit Alkohol einen Einfluss auf die Entwicklung eines NZK hat, ist die Studienlage nicht einheitlich. So existiert die Auffassung, dass moderater Alkoholkonsum mit einem verminderten Risiko einhergeht (Greving et al. 2007), während eine andere Studie differenziert, dass dieser Zusammenhang nur bei Frauen beobachtet werden konnte (Parker et al. 2002). Eine dritte Studie konnte hingegen überhaupt keinen Zusammenhang zwischen Alkohol und NZK feststellen (Boeing et al. 1997).

Ähnlich differenziert ist die Datenlage zum Einfluss von Übergewicht und Fettleibigkeit. Es existieren Studien, die ein erhöhtes Risiko mit steigendem BMI für Frauen anzeigen, bei Männern aber keinen eindeutigen Zusammenhang sehen (Chow et al. 1996, Lindblad et al.

1994). Wieder Andere zeigen gerade solch eine Beziehung auch für Männer (Chow et al. 2000) oder zumindest für beide Geschlechter einen starken Zusammenhang bei extremen BMI-Werten (Hu et al. 2003a).

Anscheinend können auch erhöhte Blutdruckwerte bei Männern zu einer Risikosteigerung führen. Dies wurde für diastolische Werte >90mmHg und für systolische Werte >150mmHg dargestellt, wobei sich das Risiko mit steigenden Blutdruckwerten erhöhte und bei sinkenden Werten wieder reduzierte (Chow et al. 2000).

Als weiterer ätiologischer Faktor werden Infektionen des harnbildenden und harnableitenden Systems diskutiert (Parker et al. 2004).

Als gesichert kann hingegen betrachtet werden, dass NZK gehäuft bei Patienten mit dialysepflichtiger Niereninsuffizienz vorkommen (Kojima et al. 2006, Farivar-Mohseni et al. 2006). Inwieweit das Risiko mit steigender Dialysedauer zunimmt, ist noch nicht endgültig geklärt. So wurde in einer Untersuchung ein Trend dorthin festgestellt, wobei aber die Möglichkeit besteht, dass dies auf die sehr kleine Patientenpopulation zurückzuführen ist (Denton et al. 2002).

Es existieren einige genetische Prädispositionen, die zu Formen von familiären NZK führen. Klarzellige NZK treten gehäuft beim von Hippel-Lindau Syndrom auf, wobei dabei die Tumoren bevorzugt multifokal und bilateral und ca. 25 Jahre früher imponieren, als NZK außerhalb dieses Syndroms. Auch ist die 10-Jahres-Überlebensrate deutlich besser (Neumann et al. 1998). Außerhalb des VHL-Syndroms existieren weitere Translokationen des Chromosoms 3 mit anderen Chromosomen (6, 8, 11 und 12), die für seltenere Formen der vererbten klarzelligen NZK ursächlich sein können (Cohen et al. 1979, Maher und Yates 1991, Pathak et al. 1982, Wang und Perkins 1984).

Vererbte papilläre NZK zeigen multifokales und bilaterales Wachstum. Das Erkrankungsalter liegt bei etwa 52 Jahren (Zbar et al. 1995). Es handelt sich um einen autosomal dominanten Erbgang, bei dem es zu einer Missense-Mutation auf dem Chromosom 7 kommt (Schmidt et al. 1997).

Vererbte Onkozytome sind eine heterogene Gruppe, die keine spezifischen genetischen Veränderungen zeigen und weltweit bisher lediglich bei 5 Familien beschrieben wurden (Weirich et al. 1998).

2.3. TNM-Klassifikation

Die Beurteilung eines Nierenzellkarzinoms kann an Hand der aktuellen TNM-Klassifikation der UICC von 2002 vorgenommen werden, durch welche die Ausbreitung und Größe des Primärtumors (T), der Befall regionärer Lymphknoten (N) und das Vorkommen von Fernmetastasen (M) beschrieben wird.

T-Primärtumor

- **TX** Primärtumor kann nicht beurteilt werden
- **T0** Kein Anhalt für Primärtumor
- **T1** Tumor 7 cm oder weniger in größter Ausdehnung, begrenzt auf Niere
 - **T1a** Tumor 4cm oder weniger in größter Ausdehnung
 - **T1b** Tumor mehr als 4cm, aber nicht mehr als 7cm in größter Ausdehnung
- **T2** Tumor größer 7cm in größter Ausdehnung, begrenzt auf Niere
- **T3** Tumor breitet sich in größere Venen aus oder infiltriert Nebenniere oder perirenales Gewebe, jedoch nicht jenseits der Gerota-Faszie
 - **T3a** Tumor infiltriert Nebenniere, oder perirenales Gewebe, aber nicht jenseits der Gerota-Faszie
 - **T3b** Tumor mit makroskopischer Ausbreitung in Nierenvene(n) oder Vena cava unterhalb des Zwerchfells
 - **T3c** Tumor mit makroskopischer Ausbreitung in Vena cava oberhalb des Zwerchfells
- **T4** Tumor infiltriert über die Gerota-Faszie hinaus

Klassifikation der regionären Lymphknoten N

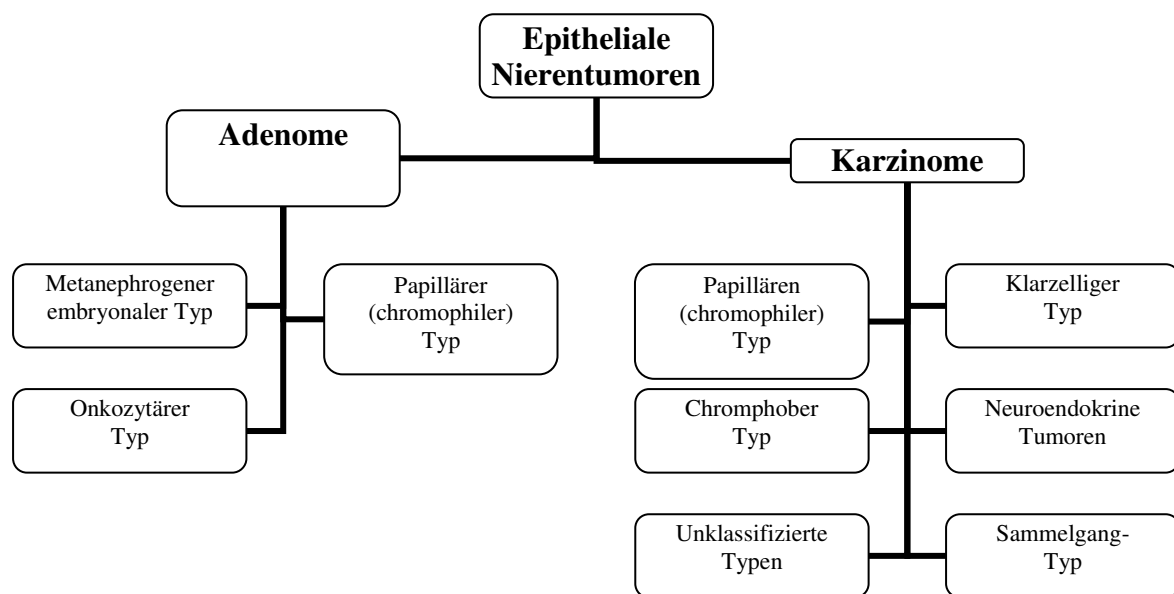
- **NX** Regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden
- **N0** Keine regionären Lymphknotenmetastasen
- **N1** Metastase in einem regionären Lymphknoten
- **N2** Metastasen in mehr als einem regionären Lymphknoten

Klassifikation der Fernmetastasen M

- **MX** Vorhandensein von Fernmetastasen kann nicht beurteilt werden
- **M0** Keine Fernmetastasen
- **M1** Fernmetastasen

2.4. Histologische Einteilung der epithelialen Nierentumoren

Die Subtypisierung in Organigramm 1 beruht auf den Kriterien der Konsensus-Konferenz der UICC und dem AJCC von 1997. Dabei wird berücksichtigt, dass den morphologischen Subtypen, die spezielle zytologische und histologische Merkmale aufweisen, ein jeweils spezieller Genotyp zugrunde liegt (Storkel 1999).



Organigramm 1

Aus: S. Störkel, Urologe [A] 1999 ' 38: 425±432 _ Springer-Verlag 1999

Epitheliale Tumoren der Niere: Pathologische Subtypisierung und zytogenetische Korrelation

2.5. Diagnostik

Durch den routinemäßigen Einsatz der Sonographie werden ca. 70% der Nierenzellkarzinome im asymptomatischen Zustand diagnostiziert. Klinische Zeichen wie Flankenschmerz, Hämaturie oder tastbarer Tumor sind dabei eher Hinweis auf ein fortgeschrittenes Tumorstadium. Bei Laboruntersuchungen festgestellte Anämie, Erythrozytose oder Thrombozytose bzw. Erhöhung der AP können den Verdacht erhärten, reichen aber als alleinige Diagnostik nicht aus. Ferner sollte bei Tumorverdacht die Niere immer mit Hilfe

einer Sonographie, in longitudinaler und transversaler Schnittebene, sowie eine Computertomographie in Nativtechnik und als Kontrastmittelserie beurteilt werden. Bei Verdacht auf Tumorthromben in Vena cava oder Vena renalis kann eine MRT durchgeführt werden. Ein Röntgenthorax ist im Zuge des Stagings immer indiziert. Sollte sich hier eine Raumforderung darstellen, ist zur weiteren Abklärung eine CT erforderlich. Eine Funktionsuntersuchung beider Nieren durch eine Szintigraphie oder eine Ausscheidungsurographie sollte vor Tumornephrektomie erfolgen. Eine Skelettszintigraphie kann bei symptomatischen Patienten, erhöhter AP oder einem fortgeschrittenen Tumorstadium zur Ergänzung des Stagings erfolgen (Schmelz et al. 2006) (AWMF-Leitlinie von 2003)

2.6. Therapie

2.6.1. NZK im lokalisierten Stadium

Die einzige kurative Therapieoption ist die Tumornephrektomie (Robson et al. 2002). Eine laparoskopische Operation ist dabei auf Grund höherer Risiken für intra- und postoperative Komplikationen ausgewählten erfahrenen Zentren vorbehalten (Ljungberg et al. 2007). Bei kleinen peripheren Tumoren ist die partielle Tumornephrektomie Therapie der Wahl (Shuch et al. 2006). Des Weiteren ist bei unauffälligen präoperativen CT-Befunden eine Adrenaektomie nicht angezeigt (Kuczyk et al. 2002). Eine ausgedehnte Lymphadenektomie scheint keinen Einfluss auf das Langzeitüberleben der Patienten zu haben und kann deshalb auf die perihiliären Lymphknoten beschränkt bleiben, um das Staging zu komplettieren (Ljungberg et al. 2007). Adjuvante Therapiestrategien im Sinne einer Immunchemotherapie haben keinen Nutzen bei lokalisierten Nierenzellkarzinomen (Atzpodien et al. 2005).

2.6.2. Fortgeschrittenes NZK

2.6.2.1. Immuntherapie

Die Therapie des fortgeschrittenen Nierenzellkarzinoms ist stets als palliativ zu betrachten und orientiert sich primär am Nutzen für den Patienten, vor allem mit Blick auf das

Gesamtüberleben. Die Immuntherapie war dabei lange Zeit die Therapie der Wahl, ehe man durch die Entwicklung molekularer Therapien weitere Alternativen zur Verfügung hatte. In einer Metaanalyse von 2008 wurde gezeigt, dass IFN-alpha gegenüber einer Kontrollgruppe ohne Immuntherapie das mediane Überleben um 3,8 Monate erhöht, die 1-Jahres-Mortalität um 44% und das Todesrisiko in den ersten zwei Jahren um 26% reduziert. Gleichzeitig stellte sich heraus, dass eine Hochdosis-IL2-Therapie keinen Gesamtüberlebensvorteil gegenüber einer Zytokintherapie mit reduzierter Dosis erbringt und diese wiederum keinen Vorteil gegenüber einer weniger giftigen alleinigen IFN-alpha-Therapie (Coppin et al. 2005).

Dennoch ist zu bemerken, dass durch eine gezielte Selektion der Patienten weitere Therapieoptionen zur Auswahl stehen. Patienten mit hervorragendem Allgemeinzustand (ECOG performance status 0 oder 1) und Metastasen bei Diagnosestellung haben durch eine initiale Debulking-Nephrektomie mit anschließender IFN-alpha-Therapie eine Verbesserung des Überlebens um annähernd 5 Monate gegenüber alleiniger IFN-alpha-Therapie (Flanigan et al. 2001, Mickisch et al. 2001).

Weiterhin können Patienten mit sehr schlechter Prognose, auf Grund von Knochen- oder Leber-Metastasen bzw. R1- oder R2-Resektion, aber mit noch sehr gutem Allgemeinbefinden und guter Organfunktion von einer Hochdosis-IL2-Therapie profitieren (McDermott et al. 2005).

2.6.2.2. Targeted Therapy

Das Ziel der verschiedenen Therapieansätze ist eine Kontrolle der Angiogenese, die beim NZK, im Besonderen beim klarzelligen Typ, häufig unkontrolliert abläuft (Pantuck et al. 2003) und damit einen grundlegenden Wachstumsfaktor der Tumoren darstellt. Bisher werden die Substanzen vorwiegend beim klarzelligen Typ eingesetzt.

So erfolgt nach den aktuellen Empfehlungen der European Association of Urology von 2009 die First-line-Therapie nach einer Risikostratifizierung mit Hilfe des Motzer-Scores, der die Patienten an Hand von 5 Kriterien in drei Prognosegruppen, günstige, intermediäre und schlechte Prognose, einteilt (Motzer et al. 1999).

Bei einer günstigen und intermediären Prognose erfolgt die Behandlung zunächst mit Sunitinib oder einer Kombination aus Bevacizumab und INF-alpha.

In einer Studie zeigte sich, dass Patienten aus einer dieser beiden Gruppen mit einer Sunitinib-Monotherapie gegenüber einer INF-alpha-Therapie ein signifikant längeres Progressions-

freies Überleben hatten (11 vs. 5 Monate, $p < 0,001$), zudem lag das Gesamtüberleben bei 26,4 bzw. 21,8 Monate im Sunitinib bzw. INF-alpha-Arm ($p = 0,05$). Auch ein Wechsel aus dem INF-alpha-Arm in den Sunitinib-Arm führte zu einer Verlängerung der medianen Überlebensrate von 20 auf 26,4 Monate ($p = 0,03$) (Figlin et al. 2008). Zudem berichteten die Patienten aus der Sunitinib-Gruppe über eine bessere Lebensqualität, was vermutlich auf das unterschiedliche Nebenwirkungsprofil zurückzuführen ist (Motzer et al. 2007).

Die kombinierte Gabe von Bevacizumab und INF-alpha scheint gegenüber der alleinigen INF-alpha-Gabe, als Kontrollgruppe, einen positiven Einfluss auf das Gesamtüberleben zu haben. Während die Kontrollgruppe zum Studienabschluss ein medianes Gesamtüberleben von 19,8 Monaten zeigte, war diese in der Bevacizumabgruppe noch nicht erreicht. Festzuhalten ist, dass das mediane progressionsfreie Überleben in der Bevacizumabgruppe mit 10,2 Monaten im Vergleich zu 5,4 Monaten in der Kontrollgruppe signifikant länger ($p = 0,0001$) war. Diese Ergebnisse lassen sich allerdings nur in der Gruppe der Patienten mit niedrigem und mittlerem Risiko erzielen (Escudier et al. 2007a).

Bei Patienten mit schlechter Prognose führt die Temsirolimus-Monotherapie gegenüber der alleinigen Therapie mit INF-alpha zu einem signifikant längerem Gesamtüberleben (HR 0.73, [KI] 0.58-0.93, $p = 0,008$), 10,9 Monate in der Temsirolimus-Gruppe und 7,3 Monate in der INF-Gruppe. Die Kombination beider Substanzen bringt keinen signifikanten Vorteil gegenüber der alleinigen INF-Therapie (Hudes et al. 2007).

Bei Patienten, die eine Resistenz gegenüber der systemischen Immuntherapie zeigen, kann nach Empfehlung der EAU Sorafenib als Second-line-Therapie in Betracht gezogen werden. Das mediane progressionsfreie Überleben verlängert sich von 2,8 Monaten unter Placebo auf 5,5 Monate in der Sorafenib-Gruppe (Escudier et al. 2007b). Inwieweit das Gesamtüberleben beeinflusst wird, ist allerdings unklar, da nach Studienschluss die Patienten der Placebo-Gruppe auf Sorafenib umgestellt wurden.

Nach Versagen der Therapie mit Tyrosinkinaseinhibitoren kann Everolimus als mTOR-Inhibitor verwendet werden. In einer Studie, die Everolimus in Kombination mit einer bestmöglichen supportiven Therapie gegenüber einer ebensolchen mit Placebo verglich, verlängerte sich das progressionsfreie Überleben von 1,9 Monaten unter Placebo auf 4 Monate unter Everolimus ($p < 0,001$) (Patel et al. 2006, Motzer et al. 2008).

2.7. Genetische Veränderungen

Die zunächst histologisch definierten Subtypen der Nierenzelltumoren sind durch spezifische, voneinander differente chromosomale Veränderungen charakterisiert.

2.7.1. Klarzelliger Typ

Typisch sind hierbei Deletionen des Chromosoms 3, die in bis zu 97% der Fälle auftreten (Junker et al. 2003). Desweiteren finden sich Zugewinne auf Chromosom 5q und 7 (Kovacs 1993). Zudem wurden weitere Allelverluste auf den Chromosomen 6, 9, 10 und 18 sowie Zugewinne auf dem Chromosom 17 beschrieben. Diese traten aber vor allem bei aggressiven Tumoren auf, so dass die Autoren diese Veränderungen als möglicherweise spezifisch für metastasierte klarzellige NZK postulierten (Junker et al. 2000).

2.7.2. Papillärer Typ

Im Gegensatz zum klarzelligen Typ stehen hier v.a. Zugewinne spezieller chromosomaler Abschnitte im Vordergrund. Davon sind typischerweise, manche Autoren sprechen von bis zu 85% der Fälle, die Chromosomen 7 und 17 betroffen, wobei hier Trisomien oder Tetrasomien auftreten (Kovacs et al. 1997, Junker et al. 2003). Mit einer zunehmenden Entdifferenzierung der Tumoren kommt es zu Überexpressionen von 3q, 12q und 16q und Verlusten des Y-Chromosoms (Junker et al. 2003).

2.7.3. Chromophober Typ

Diese Tumoren sind durch chromosomale Verluste gekennzeichnet. Es treten kombinierte Monosomien der Chromosomen 1, 2, 6, 10, 13, und 21 auf (Junker et al. 2003, Schwerdtle et al. 1996, Speicher et al. 1994).

2.7.4. Onkozytome

Für diese benignen Tumore werden verschiedene chromosomale Veränderungen beschrieben, die bei Auftreten allerdings keine spezifische Zuordnung für diesen Typ erlauben. Vielmehr ist zu beobachten, dass Onkozytome durch ihre Morphologie teilweise nur schwer von den anderen oben genannten Tumoren zu unterscheiden sind und keine der spezifischen genetischen Veränderungen der anderen Typen aufweisen. Teilweise werden Monosomien des Chromosoms 1 und bzw. oder des langen Arms des Chromosoms 14, Verluste des Y-Chromosoms und balancierte Translokationen zwischen 11q13 und anderen Chromosomen beschrieben (Presti et al. 1996, Brown et al. 1996, Junker et al. 2001).

2.8. Tumormarker

In der medizinischen Praxis hat sich in den letzten Jahren eine Reihe von Tumormarkern etabliert. So bietet beispielsweise das PSA beim Prostatakarzinom, das CA125 und das CEA beim kolorektalen Karzinom eine Hilfestellung bei der Diagnose und Verlaufskontrolle des Tumors.

Für die Nierenzelltumoren sind derzeit keine Tumormarker verfügbar.

Mit Hilfe der SELDI-TOF-MS-Untersuchungen in unserer eigenen Arbeitsgruppe konnten SAA und TTR als mögliche Biomarker bestimmt werden (Junker et al. 2009).

2.9. SAA

Für das SAA sind drei Isoformen beschrieben. Während SAA-1 und SAA-2 als Akut-Phase-Proteine in der Leber als Antwort auf Stimuli wie Traumata, Entzündungen und Stress produziert werden, ist das SAA-4 als Kofaktor für HDL notwendig.

Bereits bei verschiedenen Tumoren wie dem Lungen-, dem Magen- oder dem Prostatakarzinom wurde SAA im Hinblick auf seine Aussagekraft als Tumormarker untersucht.

2.10. TTR

Transthyretin ist als Transportprotein für Thyroxin und Trijodthyronin im Blut vorhanden über das RBP am Transport von Vitamin A beteiligt. Ein Absinken im Serum kann durch Stress im Allgemeinen bedingt sein, ist aber vor allem bei Mangelernährung der Fall. Prinzipiell ist TTR damit zu den Anti-Akut-Phase-Proteinen zu zählen.

In Untersuchungen zum Ovarialkarzinom wurde u.a. TTR als Tumormarker näher betrachtet.

II. Zielstellung

Die Prognose der Patienten mit Nierenzellkarzinom ist in hohem Maße abhängig von der frühzeitigen Diagnose des Tumors. Besondere Beachtung erfordern dabei eine zeitnahe Differenzierung des Subtyps und die Feststellung des Vorliegens einer Metastasierung, da diese für die Auswahl der therapeutischen Maßnahmen und deren Erfolg entscheidend sind. Biomarker können einen Beitrag zur Differenzierung von spezifischen Erkrankungen und somit zu deren adäquater Behandlung leisten. Eine einfache und sichere Möglichkeit wäre dabei eine Bestimmung von Serum-Protein-Konzentrationen. In Untersuchungen mit der SELDI-TOF-MS-Technik wurden bei Nierentumoren veränderte Serumspiegel von SAA und TTR gegenüber einem gesunden Kontrollkollektiv festgestellt. Ziel dieser Arbeit war deshalb die Klärung, ob

1. SAA und TTR als Tumormarker für das Nierenzellkarzinom geeignet sind.

Hierzu sollen folgende Fragestellungen beantwortet werden:

- a. Welche Aussagekraft haben SAA- und TTR-Serum-Konzentrationen zur Differenzierung der einzelnen Subtypen des Nierenzellkarzinoms?
- b. Besteht eine Korrelation zwischen SAA- und TTR-Serum-Konzentrationen und der Metastasierung beim Nierenzellkarzinom?
- c. Wie ist der postoperative Verlauf der SAA-Serum-Konzentration bei Patienten nach Tumornephrektomie?
- d. Wie unterscheidet sich die SAA-Serum-Konzentration beim Nierenzellkarzinom im Gegensatz zum Harnblasenkarzinom?

2. Können SAA- und TTR-Serum-Konzentration zur Vorhersage der Abstoßungsreaktion bei Nierentransplantationen einen Beitrag leisten?

III. Material und Methode

1. Patientengut

Alle Serumproben wurden aus der Tumorbank der Klinik für Urologie des Universitätsklinikums Jena entnommen. Die Aufnahme der verwendeten Proben in die Tumorbank erfolgte zwischen 1994 und 2008. Die Messungen wurden von August 2007 bis März 2009 durchgeführt. Als Ausgangsbasis wurde ein Patientenkollektiv verwendet, bei dem mittels SELDI-TOF-MS SAA als Kandidatenprotein für die Verwendung als Biomarker beim Nierenzellkarzinom identifiziert werden konnte (Junker et al. 2006).

Dieses Kollektiv wurde mit Blick auf die Fragestellung erweitert. Die Patientengruppe bestand insgesamt aus 315 Personen, von denen 298 für SAA und 213 für TTR in die statistische Auswertung eingingen. Von diesem Patientenkollektiv hatten 58 Patienten ein klarzelliges, 28 ein papilläres und 12 ein chromophobes Nierenzellkarzinom. 15 Patienten mit Onkozytomen wurden in die Patientengruppe aufgenommen. Bei allen Patienten mit Nierentumoren bestand die primäre Therapie in einer Tumornephrektomie.

Das Patientenkollektiv bestand zudem aus 29 Patienten mit einem Harnblasenkarzinom, 26 Patienten, die nach einer Nierentransplantation eine Abstoßungsreaktion zeigten und 30 Patienten, bei denen keine Abstoßungsreaktion auftrat. Die Kontrollgruppe bestand aus 44 gesunden Personen. Die Geschlechter- und Altersverteilung dieser Patienten sind in Tabelle 1 zusammengefasst, Details zu den klinischen Charakteristika in Tabelle 2.

Gruppe	N	Geschlecht		Alter			
		w	m	Median	Mittelwert	Min	Max
Nierenzellkarzinome							
klarzellig	58	30	28	61	61	32	84
papillär	28	5	23	64	63	42	80
chromophob	12	4	8	62	59	32	71
Onkozytome	15	7	8	63	65	56	77
Blasenkarzinome	29	8	21	66	66	46	78
NTx ohne Abstoßung	30	11	19	50	50	26	71
NTx mit Abstoßung	26	10	16	56	55	39	67
Kontrolle	44	27	17	33	35	21	60

Tabelle 1: Geschlechter- und Altersverteilung des Patientenkollektivs der NZK, Blasenkarzinome, Patienten nach Nierentransplantation und der Kontrollgruppe

Tumortyp	N	pT						Grading					
		a	1	2	3	4	k.A.	1	2	3	4	k.A.	
klarzellige NZK	58	-	8	34	16	-	-	11	37	9	-	1	
met.	30	-	6	10	14	-	-	1	19	9	-	1	
nichtmet.	28	-	2	24	2	-	-	10	18	-	-	-	
papilläre NZK	28	-	7	16	5	-	-	3	18	3	-	4	
	8	-	-	4	4	-	-	-	4	3	-	1	
	20	-	7	12	1	-	-	3	14	-	-	3	
chromophobe NZK	12	-	9	3	-	-	-	1	10	-	-	1	
Blasen-Karzinome	29	10	9	3	6	1	-	5	13	11	-	-	

Tabelle 2: Darstellung der histopathologischen und klinischen Parameter der Patienten mit Nieren- und Harnblasentumoren

In Tabelle 3 sind die Geschlechts- und Altersverteilung zur Gruppe der Patienten, bei denen eine Tumornephrektomie durchgeführt wurde (56 Patienten), dargestellt.

Gruppe	N	Geschlecht		Alter			
		w	m	Median	Mittelwert	Min	Max
prä-Op	56	26	30	63	63	34	88
1.Tag post-Op	34	16	18	61	60	34	76
7.Tag post-Op	36	16	20	63	63	42	88
1.-3. Monat post-Op	17	10	7	63	61	42	79
4.-7. Monat post-Op	15	3	12	66	64	44	76
>7.Monat post-Op	8	4	4	65	64	42	80

Tabelle 3: Darstellung der erfassten Patienten zur Analyse des postoperativen Verlaufs nach Tumornephrektomie

Von den Patienten mit einem klarzelligen Nierenzellkarzinom wiesen 30 Metastasen auf, bei 28 Personen waren keine Metastasen nachweisbar, wobei diese Patienten jeweils mindestens 36 Monate nachbeobachtet wurden und der mediane Nachbeobachtungszeitraum bei 94 Monaten (40 bis 156 Monate) lag. Bei den Patienten mit Metastasen konnte bei jeweils 22 der Zeitpunkt der Metastasierung als weiteres Gruppenmerkmal dargestellt werden. Dabei wurde zum Einen zwischen primärer und sekundärer und zum Anderen zwischen früher und später Metastasierung unterschieden. Primäre Metastasen waren bereits zum Zeitpunkt der Operation vorhanden, während sekundäre erst im Verlauf nach der Operation diagnostiziert wurden. Als frühe Metastasen wurde solche gewertet, die sich zum Zeitpunkt der Operation oder innerhalb von 24 Monaten postoperativ manifestierten. Analog dazu wurden Metastasen, die sich nach mehr als 24 Monaten darstellten, als späte bezeichnet. Von den insgesamt 22 Patienten in dieser Gruppe waren 17 früh und 5 spät metastasiert. Die frühen Metastasen

traten im Median 5 Monate nach Operation auf (0 bis 23 Monate), die späten nach median 40 Monaten (24 bis 61 Monate).

Die Zusammenschau dieser Daten finden sich in Tabelle 4.

	Auftreten der Metastasen [Monate]					Nachbeobachtungszeitraum [Monate]			
	N	Median	Mittelwert	Min	Max	Median	Mittelwert	Min	Max
Metastasierung									
primär	7	-	-	-	-	-	-	-	-
sekundär	15	14	20	5	61	-	-	-	-
früh	17	5	6	0	23				
spät	5	40	39	24	61				
Ausschluss	8								
keine Metastasen	28	-	-	-	-	94	90	40	156

Tabelle 4: Darstellung des Nachbeobachtungszeitraumes und Metastasenzeitpunktes bei Patienten mit einem klarzelligen NZK

Primär = Metastasen zum Op-Zeitpunkt

Sekundär = Metastasierung im Verlauf nach Operation

Früh = Metastasen < 24 Monaten nach Operation

Spät = Metastasen > 24 Monate nach Operation

2. Methodik

2.1. Probengewinnung

Die Blutentnahme erfolgte in eine 9ml Serum-Monovette (Sarstedt AG, Nümbrecht, Deutschland). Anschließend erfolgte eine Zentrifugation mit 3500/min für 10 Minuten (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland). Das Serum wurde abpipetiert und in 2ml Cryo.s-RöhrchenTM (Greiner Bio-one International, Kreusmünster, Österreich) verteilt. Diese wurden bis zur Verwendung bei -80°C (Sanyo Biomedical, Wood Dale, IL USA) gelagert.

2.2. ELISA

2.2.1. Grundlagen der ELISA-Technik

Bei der ELISA-Technik handelt es sich um einen oberflächengebundenen Immuntest.

Die Wand des Reaktionsgefäßes ist mit monoklonalen Antikörpern beschichtet, die jeweils spezifisch die zu untersuchenden Antigene binden. Nach Zugabe einer Probe wird in einem zweiten Schritt ein mit Biotin markierter sekundärer Antikörper hinzugefügt, der an das an den wandständigen Antikörpern gebundene Antigen bindet. Es folgt nach einer Inkubationszeit ein Waschvorgang, durch den alle nicht gebundenen Moleküle entfernt werden sollen. Anschließend wird ein Streptavidin-Peroxidase-Komplex zugegeben. Das Streptavidin bindet sich hochaffin an das Biotin. Eine zweite Variante besteht darin, dass der Streptavidin-Peroxidase-Komplex schon an den mit Biotin markierten Anti-Antikörper gebunden ist und komplett zum zu untersuchenden Material zugegeben wird. In jedem Fall folgt ein Waschvorgang, durch den alle ungebundenen Streptavidin-Peroxidase-Komplexe bzw. Anti-Antikörper-Biotin-Streptavidin-Peroxidase-Komplexe entfernt werden. Im Weiteren wird Farbstoff als Substrat zugefügt. Die Peroxidase reagiert mit dem Substrat und erzeugt einen Farbumschlag. Nach einer erneuten Inkubation beendet die Zugabe einer Stopplösung die Farbreaktion. In einem Photometer wird die Absorption der Lösung gemessen. Durch einen Abgleich mit einer aus Standardwerten gewonnenen Standardkurve wird die Konzentration des Antigens in der Probe berechnet (Friemel 1991). Das Grundprinzip ist in Abbildung 1 noch einmal graphisch dargestellt.

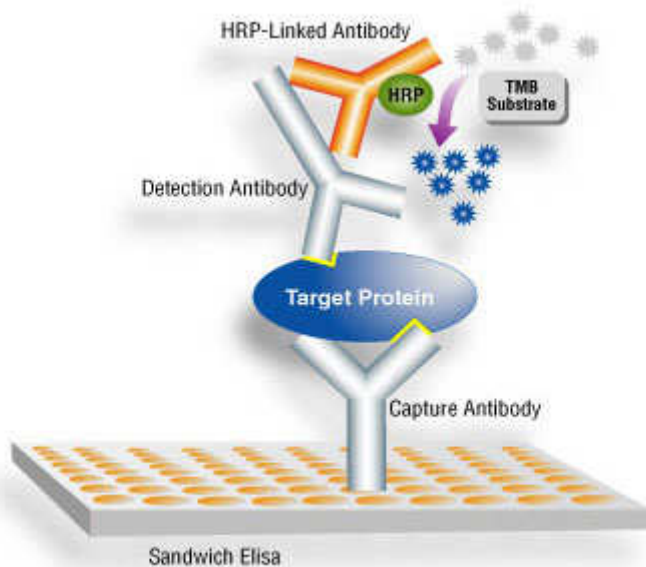


Abbildung 1: Graphische Darstellung des Prinzips eines ELISA

Quelle: http://newenglandbiolabs.de/de/index.php?option=com_content&task=view&id=18&Itemid=34

2.2.2. Messverfahren

Bei den verwendeten Human-SAA ELISA Kits (BioSource International, Camarillo, USA) und Transthyretin ELISA-Kits (Immundiagnostik AG, Bensheim, Deutschland) wurden alle benötigten Reagenzien mitgeliefert. Die Messungen erfolgten jeweils in Doppelbestimmung. Die Bestimmung der Absorptionswerte erfolgte mit dem Photometer GENios (TecanGroup AG, Männendorf, Schweiz) und die Bearbeitung der Werte mit der Software Magellan 3.0

2.2.2.1. SAA-ELISA

2.2.2.1.1. Verdünnung der Serumproben

Im ersten Schritt wurden in einem 1,5ml Reaktionsgefäß 10µl Serum mit 190µl SDB vermischt und für 10sec geschüttelt. Danach wurden in einem weiteren 1,5ml Reaktionsgefäß 5µl der ersten Verdünnung mit 495µl SDB versetzt, für 10sec geschüttelt und auf Eis bis zur Verwendung kühl gelagert.

Im weiteren Verlauf wurde immer die verdünnte Form der Proben verwendet.

2.2.2.1.2. Verdünnung des Standards

Im Kit enthalten war ein Pulver zur Herstellung eines Standards von 600ng/ml. Nach Zufügen von 1,9ml SDB wurde die Lösung 30sec geschüttelt und dann für 10min inkubiert, um eine vollständige Rekonstitution des Standards zu gewährleisten. Um die weiteren Standards zu erhalten, wurde eine Verdünnungsreihe angelegt, bei der jeweils 300µl SDB und vorheriger Standard in einem 1,5ml Reaktionsgefäß zusammengefügt und für 10sec geschüttelt wurden. Dieser Schritt wurde in weiteren Reaktionsgefäßen wiederholt, bis durch die Verdünnung alle Standards von 300ng/ml, 150ng/ml, 75ng/ml, 37,5ng/ml, 18,8ng/ml und 9,4ng/ml hergestellt worden waren. Als Standard für 0ng/ml wurde SDB benutzt. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Proben auf Eis kühl gelagert.

2.2.2.1.3. Verdünnung des Streptavidin-Konzentrats

Im Kit enthalten war ein Streptavidin-Konzentrat, das sich gekühlt in einem viskösen Zustand befand. Vor der Verdünnung wurde es zur Verflüssigung für 20min bei Raumtemperatur erwärmt. Dann wurden in einem 15ml Reaktionsgefäß 120µl des Konzentrats mit 12ml des Streptavidin Diluents vermischt und für 10sec geschüttelt. Bis zur Verwendung wurde es auf Eis kühl gelagert.

2.2.2.1.4. Verdünnung des Waschpuffers

Im Kit enthalten war ein Waschpuffer-Konzentrat. Vor der Verwendung wurde es 10min außerhalb des Kühlschranks bei Raumtemperatur erwärmt. Danach wurde es 20sec geschüttelt. Zur Herstellung des Arbeits-Waschpuffers wurden in einem 1,5l Reaktionsgefäß 50ml des Waschpuffer-Konzentrats mit 1200ml destilliertem Wasser vermischt und für 20sec geschüttelt.

2.2.2.1.5. Messung

Zur Aktivierung der Mikrotiterplatte wurden in jede Reaktionskammer je 100µl SDB gegeben, mit Ausnahme der Kammer für den Leerwert. Im nächsten Schritt wurden, nach dem vorliegenden Pipettierschema, die Reaktionskammern mit 100µl des jeweiligen Standards oder der jeweiligen Probe beladen. Zu jedem Standard und jeder Probe mussten daraufhin je 50µl Biotin-Konjugat hinzugefügt werden.

Für 30 Sekunden erfolgte durch Schütteln eine Vermischung der Lösungen und daraufhin eine Inkubation für eine Stunde bei 37°C. Nach der Inkubation wurden die Reaktionsgefäße viermal mit je 300µl Waschpuffer pro Reaktionskammer gewaschen. Nach Beendigung des Waschvorgangs wurde jede Kammer, mit Ausnahme des Leerwertes, mit je 100µl des Streptavidin-HRP beladen und für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Daraufhin folgten weitere vier Waschvorgänge mittels Waschpuffer. Danach musste jede Kammer mit je 100µl Chromogen befüllt und für 30 Minuten bei Dunkelheit und Raumtemperatur inkubiert werden. Der Inhalt der Reaktionsgefäße färbte sich dadurch blau. Zum Schluss wurde jede Reaktionskammer mit 100µl Stopplösung befüllt. Dabei erfolgte ein Farbumschlag der Lösung von blau nach gelb. Durch die Stopplösung wurde die Farbreaktion zwischen Streptavidin-HRP und Chromogen beendet. Die Messung der Absorptionswerte erfolgte dann bei 450nm gegen eine Referenzwellenlänge von 595nm.

2.2.2.2. Transthyretin-ELISA

2.2.2.2.1. Verdünnung der Serumproben

Im ersten Schritt wurden 40µl Serum und 960µl Waschpuffer in ein 1,5ml Reaktionsgefäß gegeben und für 10sec geschüttelt. Dann wurden in einem zweiten 1,5ml Reaktionsgefäß 100µl der ersten Verdünnung mit 900µl Waschpuffer versetzt und ebenfalls für 10sec geschüttelt. Im letzten Schritt wurden in einem dritten 1,5ml Reaktionsgefäß 10µl der zweiten Verdünnung und 990µl Waschpuffer gegeben und nochmals 10sec geschüttelt. Bis zur weiteren Verwendung wurden die verdünnten Proben auf Eis kühl gelagert.

2.2.2.2.2. Herstellung des Standards

Im Kit enthalten waren lyophilisierte Standards mit Konzentrationen von 0ng/ml, 1,6ng/ml, 6,25ng/ml, 25 ng/ml und 100ng/ml. Zur Rekonstitution wurde jeder Standard mit 500µl destilliertem Wasser aufgefüllt, für 20sec geschüttelt und dann für 10min zur vollständigen Lösung inkubiert. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Standards auf Eis kühl gelagert.

2.2.2.2.3. Verdünnung des Konjugats

Im Kit enthalten war ein Konjugat-Konzentrat, das mit einem Konjugat-Verdünnungspuffer vor Verwendung verdünnt werden musste. Dazu wurden in einem 15ml Reaktionsgefäß 20µl Konjugat und 10ml Konjugat-Verdünnungspuffer gemischt und 20sec geschüttelt. Bis zur weiteren Verwendung wurde das verdünnte Konjugat auf Eis kühl gelagert.

2.2.2.2.4. Verdünnung des Waschpuffers

Im Kit enthalten war ein Waschpuffer-Konzentrat. Vor der Verwendung wurde es 10min außerhalb des Kühlschranks auf Raumtemperatur erwärmt. Danach wurde es 20sec geschüttelt. In einem 1,5l Reaktionsgefäß wurden dann 100ml Waschpufferkonzentrat und 900ml destilliertes Wasser vermischt und 20sec geschüttelt.

2.2.2.2.5. Messung

Die Mikrotiterplatte wurde vor Gebrauch mit Waschpuffer aktiviert. Dazu wurde jedes Reaktionsgefäß mit 250µl Waschpuffer befüllt und nach 10sec wieder entleert. Dieser Vorgang wurde insgesamt fünfmal vorgenommen. Im nächsten Schritt wurden, nach dem vorliegenden Pipettierschema, die Reaktionskammern mit 100µl des jeweiligen Standards oder der jeweiligen Probe beladen. Bei Raumtemperatur wurde die Platte unter Schütteln dann eine Stunde inkubiert. Danach folgten fünf Waschvorgänge, die genauso durchgeführt wurden, wie die zur Aktivierung der Platte. Im nächsten Schritt wurde jedes Reaktionsgefäß, mit Ausnahme der Negativkontrolle, mit 100µl Konjugat befüllt und für eine Stunde bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubiert. Danach folgten wiederum fünf Waschvorgänge,

wie oben beschrieben. Daraufhin wurden in jedes Reaktionsgefäß 100µl TMB Substrat gegeben und die Platte für 15min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Lösung färbte sich dabei blau. Es folgte die Zugabe von 50µl Stopplösung in jedes Reaktionsgefäß zur Beendigung der Farbreaktion. Dies wurde durch einen Farbumschlag von blau nach gelb angezeigt. Die Messung der Absorptionswerte erfolgte dann bei 450nm gegen eine Referenzwellenlänge von 595nm.

3. Statistische Auswertung

Zur Aufbereitung von Tabellen wurde Microsoft Excel 2003 (Microsoft Corp., Redmond, WA USA) verwendet. Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit SPSS 11.5 (SPSS Inc., Chicago, IL USA). Für jede Gruppe wurden zunächst Histogramme der gemessenen SAA- und TTR-Konzentrationen erstellt und mit einer Normalverteilungskurve verglichen, ob eine Normalverteilung vorlag. Wenn dies nicht der Fall war, erfolgte die Testung auf Signifikanz mit dem Mann-Whitney-U-Test. Zur Ermittlung des Trennwertes zwischen zwei signifikant unterschiedlichen Gruppen, mit Sensitivität und Spezifität, wurden ROC-Kurven erstellt.

Für die Gruppe der Patienten, bei denen der perioperative Verlauf unter Beobachtung stand, wurden die Differenzen der SAA-Konzentrationen der zu vergleichenden Zeitpunkte berechnet, mit Histogrammen dargestellt und mit Hilfe der Normalverteilungskurve auf Normalverteilung überprüft. Wenn keine Normalverteilung vorlag, erfolgte die Testung auf Signifikanz mit dem Wilcoxon-Test. Sowohl beim Mann-Whitney-U-Test als auch beim Wilcoxon-Test lag Signifikanz vor, wenn $p < 0,05$ war.

IV. Ergebnisse

1. Nierenzellkarzinome

1.1 Serum Amyloid Alpha

Bei Betrachtung der Konzentrationen zeigte sich, dass klarzellige (Median 115µg/ml), papilläre (Median 92µg/ml) und chromophobe NZK (Median 54µg/ml) signifikant höhere Werte gegenüber dem Kontrollkollektiv (Median 33µg/ml) annahmen ($p=0,000$, $p=0,000$ und $p=0,012$). Onkozytome wiesen mit median 19 µg/ml geringere Werte auf als das Kontrollkollektiv (Median 33 µg/ml). Dieser Unterschied war allerdings mit $p=0,329$ nicht signifikant. Eine Zusammenschau aller dieser Werte findet sich in Tabelle 5, die grafische Darstellung in Abbildung 2.

Gruppe	Median	Mittelwert	Min	Max
Klarzellige NZK	115	364	19	2672
Papilläre NZK	92	219	23	1747
chromophobes NZK	54	209	28	1729
Onkozytom	19	38	2	171
Kontrollen	33	38	2	194

Tabelle 5: SAA-Konzentrationen der einzelnen Subgruppen des Nierenzellkarzinoms und des Kontrollkollektives in µg/ml

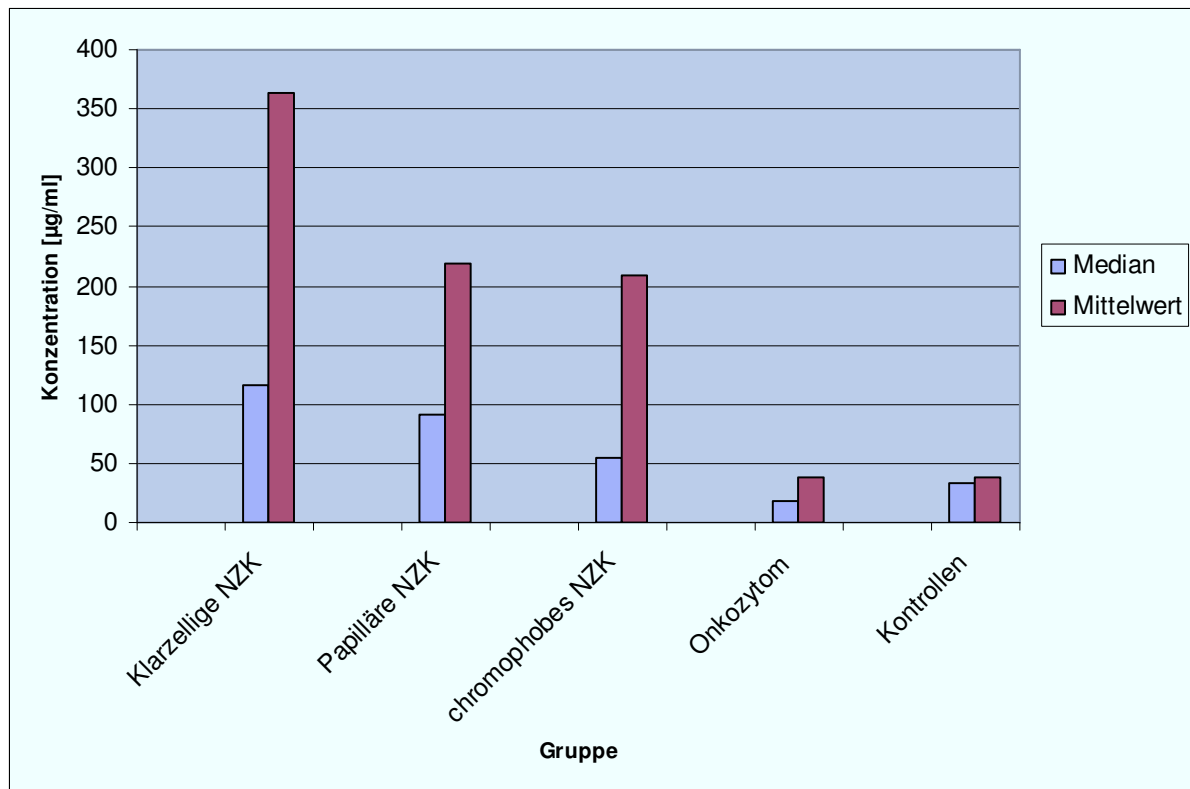


Abbildung 2: Balkendiagramm mit Darstellung der Mediane und Mittelwerte der SAA-Konzentration für die einzelnen Subgruppen des Nierenzellkarzinoms und des Kontrollkollektives in µg/ml

Die Konzentrationsunterschiede der papillären und chromophoben NZK zu den klarzelligen NZK war mit $p=0,412$ bzw. $p=0,135$ nicht signifikant. Auch im Vergleich der papillären und chromophoben NZK untereinander konnte keine Signifikanz gefunden werden ($p=0,236$). Im Vergleich der klarzelligen, papillären und chromophoben NZK mit den Onkozytomen fanden sich jeweils signifikant höhere Konzentrationen ($p=0,000$, $p=0,000$ und $p=0,009$). Eine Zusammenstellung der p-Werte findet sich in Tabelle 6.

Gruppe	klarzellig	papillär	chromophob	onkozytär	Kontrollen
klarzellig	-	0,412	0,135	0,000	0,000
papillär	0,412	-	0,236	0,000	0,000
chromophob	0,135	0,236	-	0,009	0,012
onkozytär	0,000	0,000	0,009	-	0,329
Kontrollen	0,000	0,000	0,012	0,329	-

Tabelle 6: Kreuztabelle mit Darstellung der p-Werte im Vergleich der SAA-Konzentrationen der verschiedenen Gruppen untereinander

1.1.1. Korrelation zu pT-Kategorie und Malignitätsgrad

Die Konzentrationen in der Gruppe der pT1-Tumoren lag im Median bei 91µg/ml, bei den pT2-Tumoren im Median bei 93µg/ml und bei den pT3-Tumoren im Median bei 208µg/ml. Eine grafische Darstellung dazu findet sich in Abbildung 3.

Zwischen pT1 und pT2 fand sich keine Signifikanz ($p=0,531$). Die Konzentrationen der pT3-Tumoren waren signifikant höher, als die der pT1- und pT2-Tumoren ($p=0,012$ und $p=0,024$). Bei der Gruppierung in Abhängigkeit vom Malignitätsgrad wurden bei G1-Tumoren Konzentrationen von im Median 33µg/ml, bei G2-Tumoren von im Median 110µg/ml und bei G3-Tumoren von im Median 229µg/ml gemessen. Eine grafische Darstellung dazu findet sich in Abbildung 4.

Die Konzentrationsunterschiede zwischen G1- und G2-Tumoren waren signifikant ($p=0,001$). Zudem waren die Konzentrationen der G3-Tumoren jeweils signifikant höher als die der G1- und G2-Tumoren ($p=0,000$ und $0,004$).

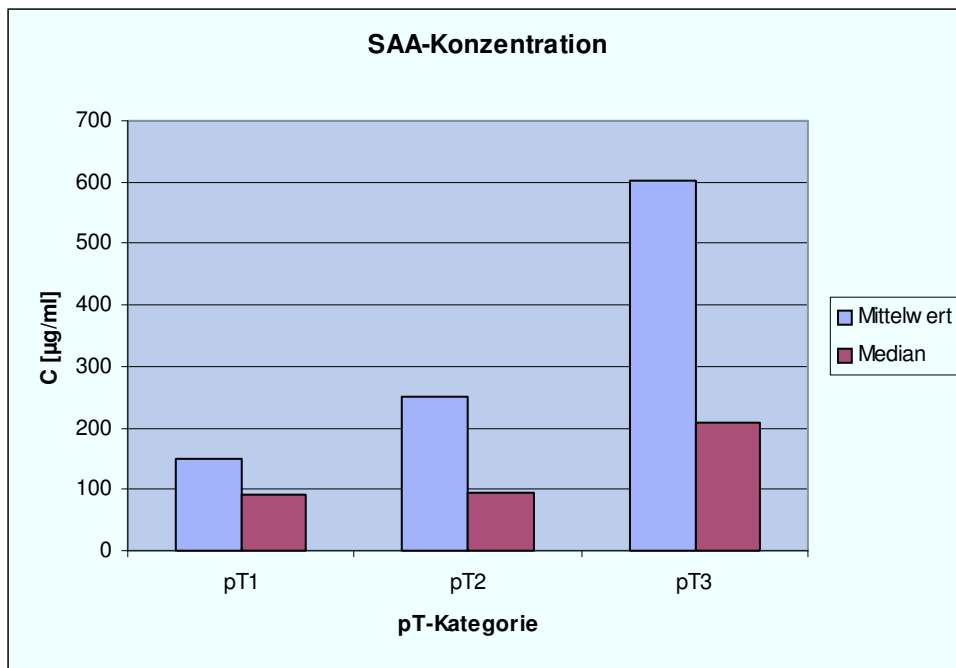


Abbildung 3: Balkendiagramm mit Darstellung der Mediane und Mittelwerte der SAA-Konzentration für die Nierenzellkarzinome unter Berücksichtigung der pT-Kategorien in µg/ml

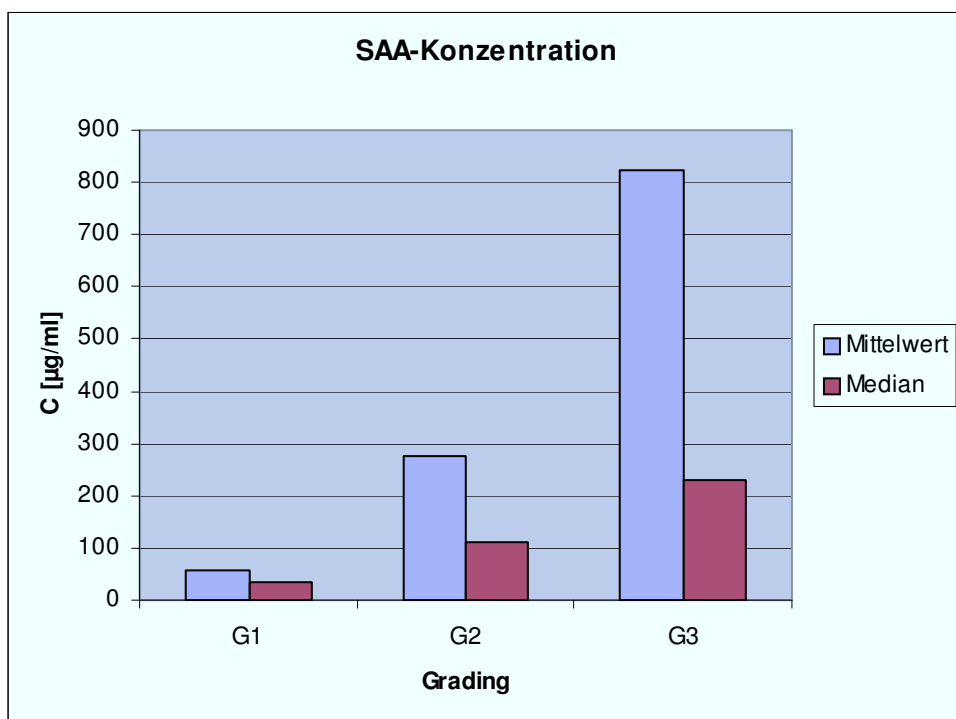


Abbildung 4: Balkendiagramm mit Darstellung der Mediane und Mittelwerte der SAA-Konzentration für die Nierenzellkarzinome unter Berücksichtigung des Malignitätsgrades in µg/ml

1.2. Transthyretin

Gegenüber den Konzentrationen, die im Kontrollkollektiv gemessen wurden (Median 452 µg/ml), waren die Werte aller Nierentumoren (Klarzellige NZK median 359µg/ml, papilläre NZK 208µg/ml, chromophobe NZK median 364µg/ml und Onkozytome median 244µg/ml) signifikant niedriger ($p=0,000$, $p=0,000$, $p=0,019$ und $p=0,000$). Eine Zusammenschau der Mediane der Konzentrationen findet sich in Tabelle 7 und Abbildung 5.

Gruppe	Median	Mittelwert	Min	Max
Klarzellige NZK	359	368	106	1058
Papilläre NZK	208	226	90	430
Chromophobe NZK	364	375	221	551
Onkozytome	244	263	132	431
Kontrollen	452	480	195	933

Tabelle 7: TTR-Konzentrationen der einzelnen Subgruppen des Nierenzellkarzinoms und des Kontrollkollektives in µg/ml

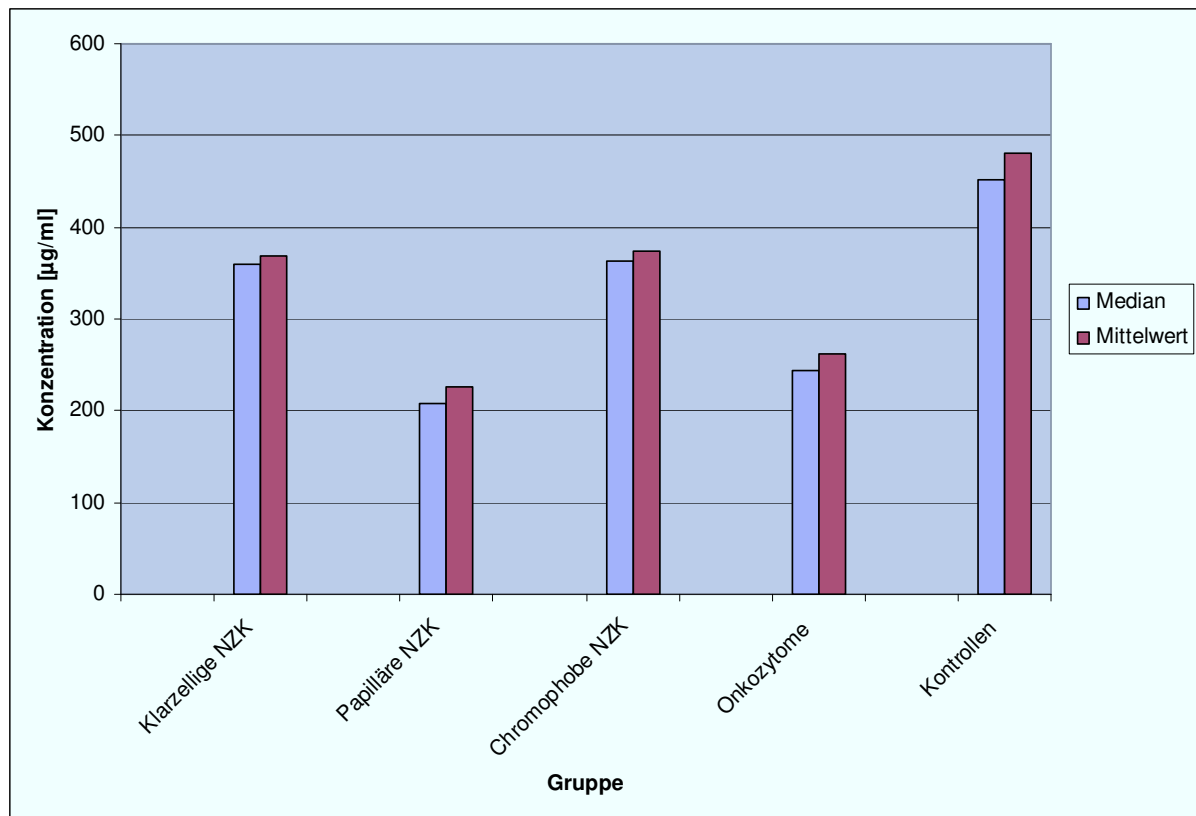


Abbildung 5: Balkendiagramm mit Darstellung der Mediane und Mittelwerte der TTR-Konzentration für die einzelnen Subgruppen des Nierenzellkarzinoms und des Kontrollkollektives in µg/ml

Papilläre NZK und Onkozytome mit median 208 µg/ml bzw. 244 µg/ml nahmen die niedrigsten Werte an. Ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Werten konnte nicht festgestellt werden ($p=0,177$). Für klarzellige und chromophobe NZK wurden höhere Konzentrationen gemessen (Median 359 µg/ml bzw. 364 µg/ml) wobei auch hier keine Signifikanz bestand ($p=0,596$). Allerdings waren diese Werte jeweils signifikant höher als die der papillären NZK und Onkozytome, wie aus den p-Werten in Tabelle 8 zu entnehmen ist.

Gruppe	klarzellig	papillär	chromophob	onkozytär	Kontrollen
klarzellig	-	0,000	0,596	0,023	0,000
papillär	0,000	-	0,000	0,177	0,000
chromophob	0,596	0,000	-	0,006	0,019
onkozytär	0,023	0,177	0,006	-	0,000
Kontrollen	0,000	0,000	0,019	0,000	-

Tabelle 8: Kreuztabelle mit Darstellung der p-Werte im Vergleich der TTR-Konzentrationen der verschiedenen Gruppen untereinander

1.2.1. Korrelation zu pT-Kategorie und Malignitätsgrad

Die Konzentrationen in der Gruppe der pT1-Tumoren lag im Median bei 299 μ g/ml, bei den pT2-Tumoren im Median bei 333 μ g/ml und bei den pT3-Tumoren bei im Median bei 252 μ g/ml. Eine grafische Darstellung dazu findet sich in Abbildung 6.

Zwischen pT1- und pT2-Tumoren fand sich keine Signifikanz ($p=0,817$), ebenso zwischen pT1- und pT3-Tumoren ($p=0,097$). Die Konzentrationen der pT3-Tumoren war jedoch signifikant niedriger als die der pT2-Tumoren ($p=0,042$).

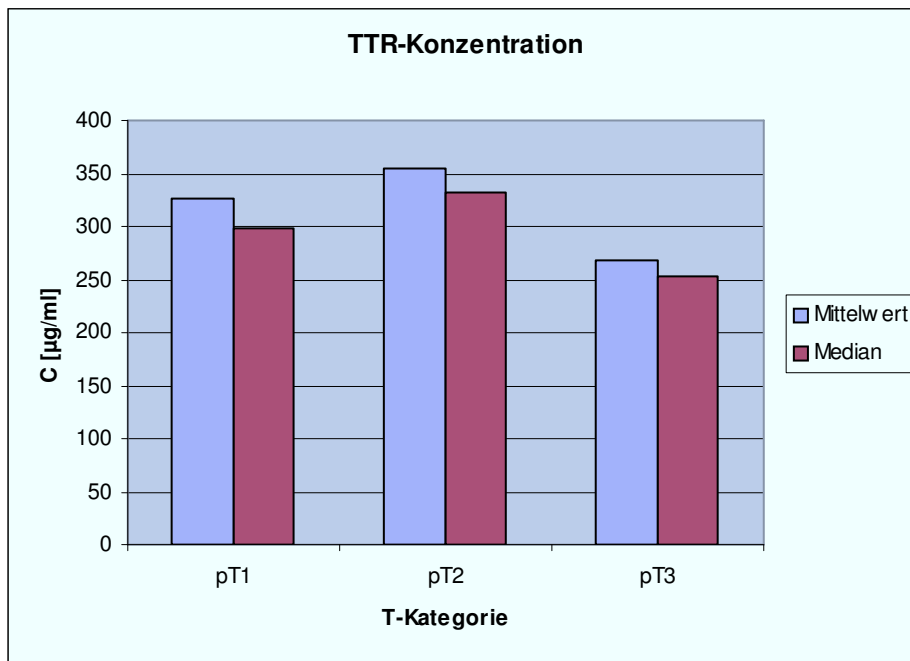


Abbildung 6: Balkendiagramm mit Darstellung der Mediane und Mittelwerte der TTR-Konzentration für die Nierenzellkarzinome unter Berücksichtigung der pT-Kategorien in µg/ml

Bei der Gruppierung in Abhängigkeit vom Malignitätsgrad wurden bei G1-Tumoren Konzentrationen von im Median 394µg/ml, bei G2-Tumoren von im Median 321µg/ml und bei G3-Tumoren von im Median 162µg/ml gemessen. Eine grafische Darstellung dazu findet sich in Abbildung 7.

Die Konzentrationsunterschiede zwischen G1- und G2-Tumoren waren nicht signifikant ($p=0,105$). Die Konzentrationen der G3-Tumoren war jeweils signifikant niedriger als die der G1- und G2-Tumoren ($p=0,003$ und $0,007$).

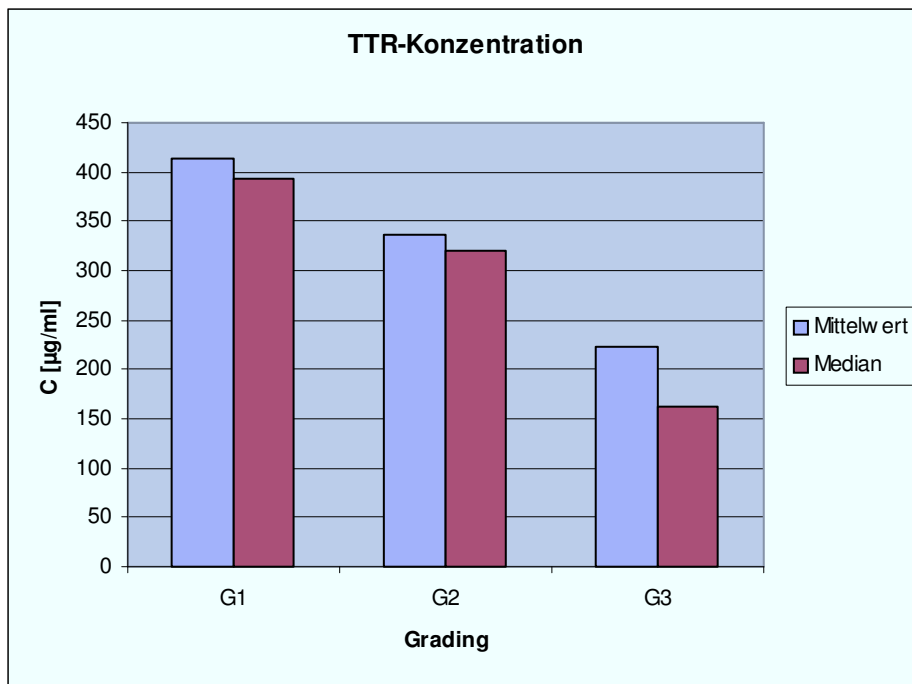


Abbildung 7: Balkendiagramm mit Darstellung der Mediane und Mittelwerte der SAA-Konzentration für die Nierenzellkarzinome unter Berücksichtigung des Malignitätsgrades in µg/ml

2. Metastasierte Nierenzellkarzinome

2.1. Serum Amyloid Alpha

Bei den klarzelligen NZK wurde beobachtet, dass metastasierte (Median 151µg/ml) gegenüber nicht-metastasierten (Median 47µg/ml) Tumoren signifikant höhere Konzentrationen aufwiesen ($p=0,001$). Auch bei den papillären NZK fanden sich bei den metastasierten mit median 174µg/ml gegenüber median 84µg/ml bei den nicht-metastasierten Tumoren höhere Werte, dieser Unterschied war mit $p=0,110$ nicht signifikant.

Im Vergleich der Nierentumoren wiesen damit die metastasierten klarzelligen NZK mit median 151µg/ml die höchsten Konzentrationen auf, wobei im Vergleich mit den papillären NZK (Median 92µg/ml) und den chromophoben NZK (Median 54µg/ml) dieser Unterschied mit $p=0,006$ bzw. $p=0,004$ signifikant war. Zur Veranschaulichung finden sich alle Mediane noch einmal in Tabelle 9 und Abbildung8.

Gruppe	Median	Mittelwert	Min	Max
Klarzellige NZK	115	364	19	2672
klarzellig met	151	555	28	2672
klarzellig nicht-met.	47	158	19	1634
Papilläre NZK	92	219	23	1747
papillär met	174	545	33	1747
papillär nicht-met.	82	88	23	158
chromophobes NZK	54	209	28	1729
Onkozytom	19	38	2	171
Kontrollen	33	38	2	194

Tabelle 9: SAA-Konzentrationen der einzelnen Subgruppen des Nierenzellkarzinoms mit der Metastasierung als weiteres Unterscheidungsmerkmal und des Kontrollkollektives in µg/ml

Für die nicht-metastasierten klarzelligen NZK mit median 47µg/ml konnte gegenüber dem papillärem Typ und dem chromophobem Typ keine Signifikanz dargestellt werden ($p=0,147$ und $p=0,919$).

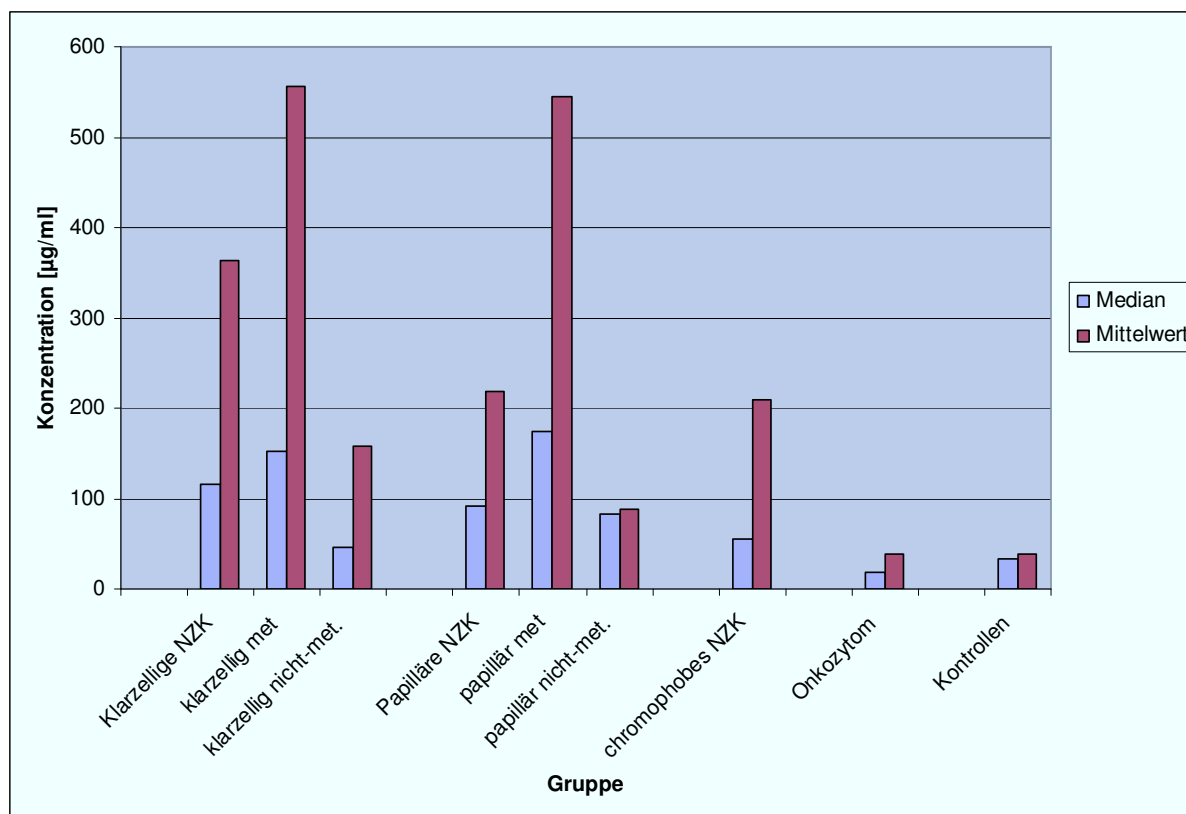


Abbildung 8: Balkendiagramm mit Darstellung der Mediane und Mittelwerte der SAA-Konzentration für die einzelnen Subgruppen des Nierenzellkarzinoms mit der Metastasierung als weiterem Unterscheidungsmerkmal und des Kontrollkollektives in µg/ml

Gruppe	klarzellig	met	nicht-met.	papillär	met	nicht-met	chromophob	onkozytär	Kontrollen
klarzellig	-	-	-	-	-	-	-	-	-
met	-	-	0,001	0,006	-	-	0,004	0,000	0,000
nicht-met.	-	0,001	-	0,147	-	-	0,919	0,002	0,002
papillär	-	0,006	0,147	-	-	-	-	-	-
met	-	-	-	-	-	0,110	-	-	-
nicht met	-	-	-	-	0,110	-	-	-	-
chromophob	-	0,004	0,919	-	-	-	-	-	-
onkozytär	-	0,000	0,002	-	-	-	-	-	-
Kontrollen	-	0,000	0,002	-	-	-	-	-	-

Tabelle 10: Kreuztabelle mit Darstellung der p-Werte im Vergleich der SAA-Konzentrationen der verschiedenen Gruppen untereinander inklusive der Metastasierung als weiterem Unterscheidungsmerkmal

In der Gruppe der metastasierten klarzelligen NZK konnte unter Betrachtung des Zeitpunktes der Metastasierung keine Signifikanz gemessen werden, wie in Tabelle 11 dargestellt. In der Gruppe mit primärer Metastasierung nahm die Konzentration im Median 126 µg/ml, in der Gruppe mit sekundärer Metastasierung im Median 169 µg/ml an. Für die frühe Metastasierung wurden Werte von median 142 µg/ml, für die späte Metastasierung von median 169 µg/ml gemessen.

Gruppe	p-Wert
primär vs. sekundär	p=0,581
früh vs. spät	p=0,493

Tabelle 11: Darstellung der p-Werte für die Gruppe der metastasierten klarzelligen NZK mit dem Metastasierungszeitpunkt als Gruppierungsmerkmal.

Primär = Metastasen zum Op-Zeitpunkt

Sekundär = Metastasierung im Verlauf nach Operation

Früh = Metastasen < 24 Monaten nach Operation

Spät = Metastasen > 24 Monate nach Operation

Bezüglich der Unterscheidung von metastasierten und nicht-metastasierten klarzelligen NZK konnte mittels ROC-Kurve (siehe Abbildung 9) ein Trennwert von 90,66 µg/ml ermittelt werden, wobei die Sensitivität bei 86,7% und die Spezifität bei 60,7% lag.

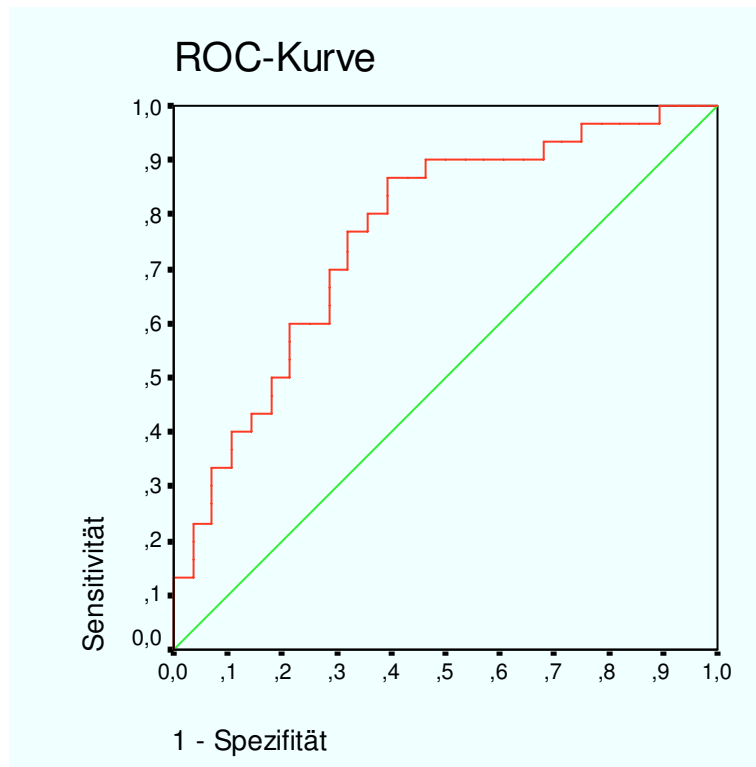


Abbildung 9: ROC-Kurve der SAA-Konzentration für die Gruppe der klarzelligen NZK mit der Metastasierung als Gruppierungsmerkmal

2.1.1. Korrelation zu pT-Kategorie und Malignitätsgrad

Bei den metastasierten klarzelligen NZK nahmen pT1-Tumoren Werte von im Median 120µg/ml, pT2-Tumoren von im Median 161µg/ml und pT3-Tumoren von im Median 235µg/ml an. Die Konzentrationsunterschiede zwischen den einzelnen Gruppen waren nicht signifikant, wie aus den p-Werten in Tabelle 12 hervorgeht. Mit dem Malignitätsgrad als Gruppierungsmerkmal konnten G2- (Median 154µg/ml) mit G3-Tumoren (203µg/ml) verglichen werden, wobei mit $p=0,438$ kein signifikanter Unterschied bestand.

Bei den nicht-metastasierten klarzelligen NZK konnte zwischen G1-Tumoren mit median 32µg/ml und G2-Tumoren mit median 104µg/ml ein signifikanter Unterschied gemessen werden ($p=0,001$).

Ein Vergleich mit den pT-Kategorien als Gruppierungsmerkmal konnte aufgrund der Gruppenstruktur nicht vorgenommen werden. Gleiches galt für die anderen Subtypen der Nierentumoren (siehe auch Tabelle2).

Gruppe	pT1	pT2	pT3	G2	G3
pT1 (N=6)	-	0,181	0,239	-	-
pT2 (N=10)	0,181	-	0,841	-	-
pT3 (N=14)	0,239	0,841	-	-	-
G2 (N=19)	-	-	-	-	0,438
G3 (N=9)	-	-	-	0,438	-

Tabelle 12: Kreuztabelle der p-Werte im Vergleich der SAA-Konzentrationen für die Gruppe der klarzelligen metastasierten NZK mit pT-Kategorie und Grading als Gruppierungsmerkmal

2.2. Transthyretin

Bei den klarzelligen NZK wurden bei Tumoren mit Metastasierung im Median 298µg/ml und ohne Metastasierung im Median 402µg/ml gemessen ($p=0,017$). Zudem zeigte sich, dass in der Gruppe der papillären NZK die metastasierten Tumoren mit median 145µg/ml deutlich geringere Konzentrationen aufwiesen, als die nicht-metastasierten mit 243µg/ml ($p=0,004$). Dementsprechend erfolgten weitere Testungen für diese beiden Typen mit der Metastasierung als Gruppierungsmerkmal. Zur Veranschaulichung sollen Tabelle 13 und Abbildung 10 dienen.

Gruppe	Median	Mittelwert	Min	Max
Klarzellige NZK	359	368	106	1058
klarzellig met	298	326	106	1058
klarzellig nicht-met.	402	413	117	1018
Papilläre NZK	208	226	90	430
papillär met	145	158	90	298
papillär nicht-met.	243	254	131	430
Chromophobe NZK	364	375	221	551
Onkozytome	244	263	132	431
Kontrollen	452	480	195	933

Tabelle 13: TTR-Konzentrationen der einzelnen Gruppen in µg/ml

Metastasierte papilläre NZK wiesen dabei die geringsten Konzentrationen aller NZK auf (Median 145µg/ml), wobei zu den Werten aller anderer Subgruppen ein signifikanter Unterschied bestand, wie auch in Tabelle 14 noch einmal dargestellt.

Gruppe	klarzellig	met	nicht-met.	papillär	met	nicht-met	chromophob	onkozytär	Kontrollen
klarzellig	-	-	-	-	-	-	-	-	-
met	-	-	0,017	-	0,002	0,259	0,146	0,336	0,000
nicht-met.	-	0,017	-	-	0,000	0,000	0,590	0,001	0,033
papillär	-	-	-	-	-	-	-	-	-
met	-	0,002	0,000	-	-	0,004	0,000	0,007	0,000
nicht met	-	0,259	0,000	-	0,004	-	0,003	0,705	0,000
chromophob	-	0,146	0,590	-	0,000	0,003	-	-	-
onkozytär	-	0,336	0,001	-	0,007	0,705	-	-	-
Kontrollen	-	0,000	0,033	-	0,000	0,000	-	-	-

Tabelle 14: Kreuztabelle mit Darstellung der p-Werte im Vergleich der TTR-Konzentrationen der verschiedenen Gruppen untereinander

Für die Gruppe der Onkozytome mit median 244µg/ml konnten keine signifikanten Unterschiede zu den nicht-metastasierten papillären mit median 243µg/ml ($p=0,705$) und zu den metastasierten klarzelligen NZK mit median 298µg/ml ($p=0,336$) gemessen werden. Dahingegen zeigten die nicht –metastasierten klarzelligen mit median 402µg/ml und die chromophoben NZK mit median 364µg/ml signifikant höhere Werte als die onkozytären Tumoren ($p=0,001$ und $p=0,006$). Zwischen diesen beiden waren wiederum keine signifikanten Unterschiede messbar ($p=0,590$).

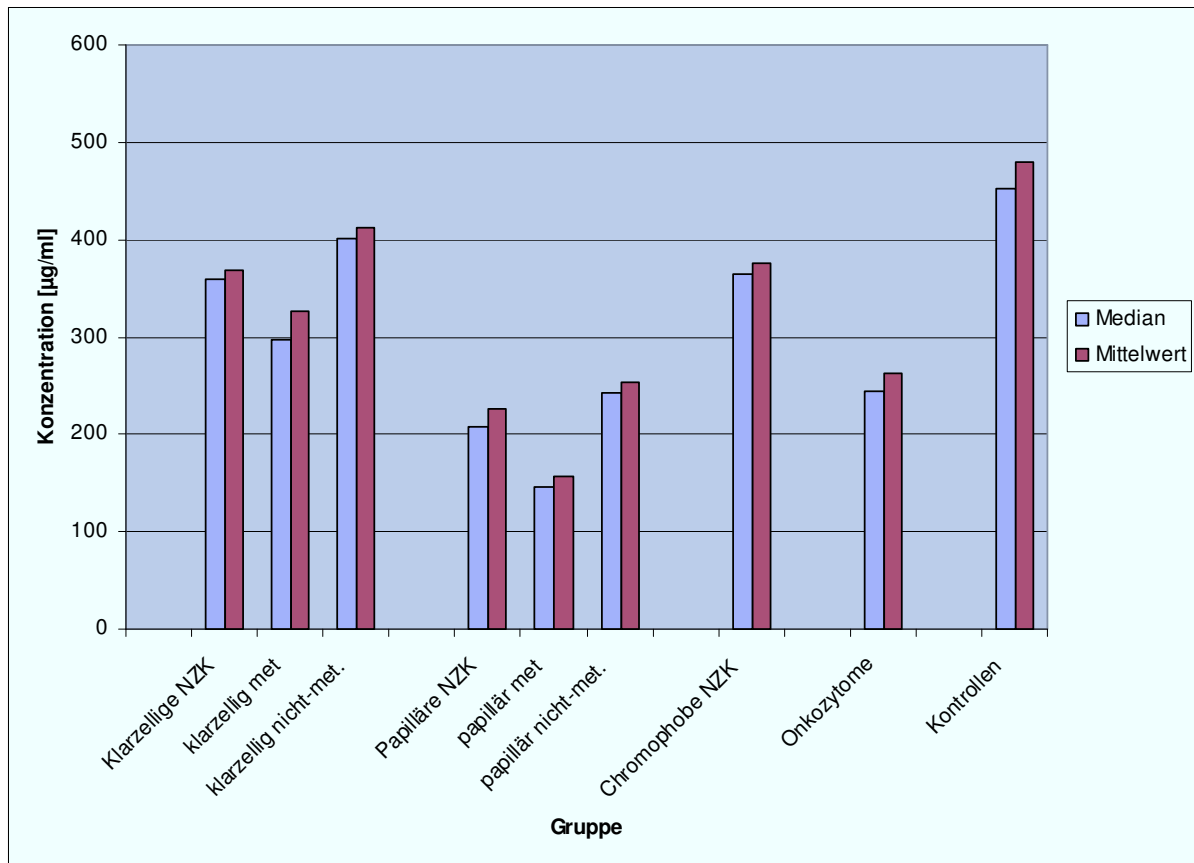


Abbildung 10: Balkendiagramm mit Darstellung der Mediane und Mittelwerte der TTR-Konzentration für die einzelnen Gruppen in µg/ml

Bei den papillären und den klarzelligen NZK wurden zudem mittels ROC-Kurve Trennwerte bestimmt, die das Vorhandensein von Metastasen anzeigen sollten. Für die papillären NZK wurde solch ein Trennwert mit 196,8µg/ml errechnet, wobei die Sensitivität 87,5% und die Spezifität 75% betrug (siehe Abbildung 11). Für die klarzelligen NZK konnte mit 339µg/ml ein Wert errechnet werden, bei dem die Sensitivität bei 63,3% und die Spezifität bei 78,6% lag (siehe Abbildung 12).

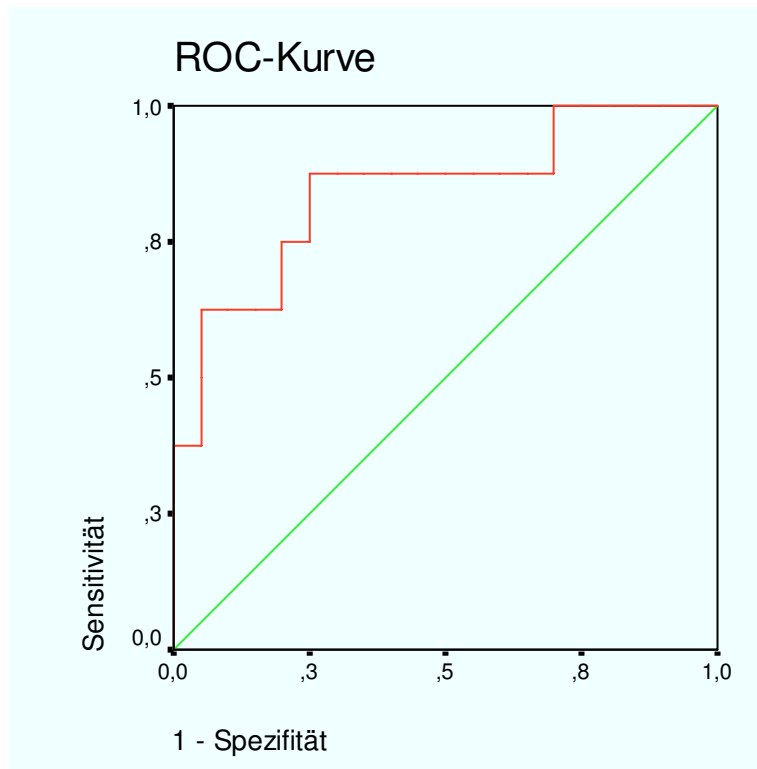


Abbildung 11: ROC-Kurve der TTR-Konzentration für die Gruppe der papillären NZK mit der Metastasierung als Gruppierungsmerkmal

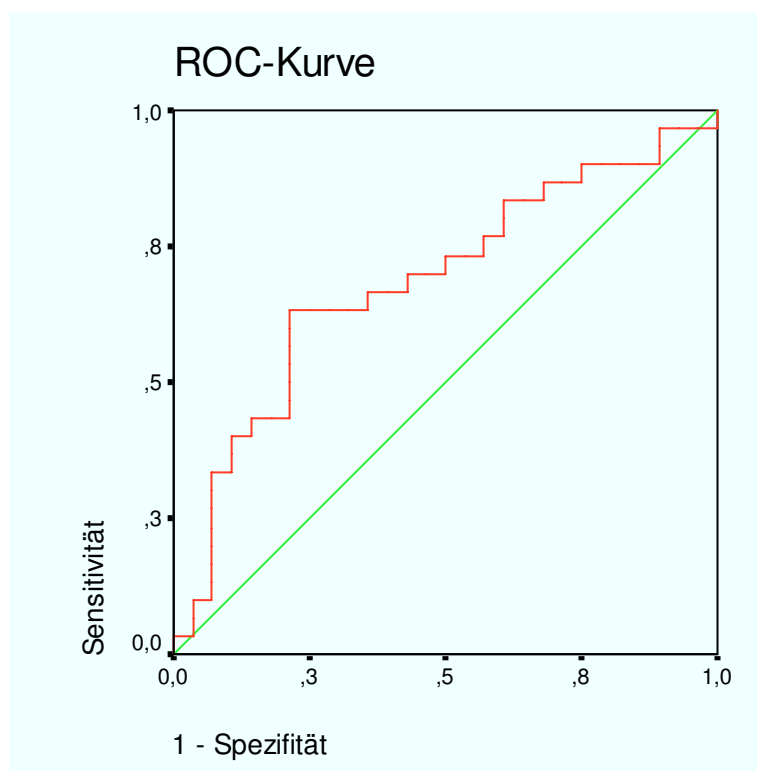


Abbildung 12 ROC-Kurve der TTR-Konzentration für die Gruppe der klarzelligen NZK mit der Metastasierung als Gruppierungsmerkmal

Für die Gruppe der metastasierten klarzelligen NZK wurde zudem getestet, ob sich zwischen primärer (Median 322µg/ml) und sekundärer (Median 300µg/ml) Metastasierung und zwischen früher (Median 300µg/ml) und später (Median 502µg/ml) Metastasierung signifikante Unterschiede in den Konzentrationen ergeben. Mit p-Werten von 0,945 und 0,359 konnten hierbei keine Signifikanzen festgestellt werden.

2.2.1. Korrelation zu pT-Kategorie und Malignitätsgrad

Bei den metastasierten klarzelligen NZK nahmen pT1-Tumoren Werte von im Median 372µg/ml, pT2-Tumoren von im Median 315µg/ml und pT3-Tumoren von im Median 272µg/ml an. Die Konzentrationsunterschiede zwischen den einzelnen Gruppen waren nicht signifikant, wie aus den p-Werten in Tabelle 15 hervorgeht. Mit dem Malignitätsgrad als Gruppierungsmerkmal konnten G2- (Median 339µg/ml) mit G3-Tumoren (172µg/ml) verglichen werden, wobei mit $p=0,033$ ein signifikanter Unterschied bestand.

Gruppe	pT1	pT2	pT3	G2	G3
pT1 (N=6)	-	0,713	0,239	-	-
pT2 (N=10)	0,713	-	0,472	-	-
pT3 (N=14)	0,239	0,472	-	-	-
G2 (N=19)	-	-	-	-	0,033
G3 (N=9)	-	-	-	0,033	-

Tabelle 15: Kreuztabelle der p-Werte im Vergleich der TTR-Konzentrationen für die Gruppe der klarzelligen metastasierten NZK mit pT-Kategorie und Grading als Gruppierungsmerkmal

Bei den nicht-metastasierten klarzelligen NZK konnte zwischen G1-Tumoren mit median 444µg/ml und G2-Tumoren mit median 378µg/ml keine Signifikanz gemessen werden ($p=0,109$). Ein Vergleich mit den pT-Kategorien als Gruppierungsmerkmal konnte aufgrund der Gruppenstruktur nicht vorgenommen werden. Gleiches galt für die anderen Subtypen der Nierentumoren (siehe auch Tabelle 2).

2.3. Serum Amyloid Alpha und Transthyretin beim klarzelligen NZK unter Berücksichtigung der Metastasierung

Die Überprüfung, ob sich die Aussagekraft bezüglich der Differenzierung zwischen metastasierten und lokal begrenzten klarzelligen NZK durch Zusammenführen der beiden Trennwerte verbessern ließe, erfolgte mit Hilfe von Vierfeldertafeln. Dabei war in einem ersten Schritt der Test als positiv gewertet worden, wenn mindestens einer der beiden Trennwerte über- bzw. unterschritten wurde, also wenn die SAA-Konzentration größer als 90,65µg/ml bzw. die TTR-Konzentration kleiner als 339,03µg/ml war. Die dazugehörigen Werte sind in Tabelle 16 zu sehen.

Test	metastasiert	nicht-metastasiert	gesamt
positiv	27	13	40
negativ	3	15	18
gesamt	30	28	58

Tabelle 16: Vierfeldertafel der klarzelligen NZK mit der Metastasierung als Gruppierungsmerkmal. Testentscheidung positiv, wenn SAA-Konzentration >90,65 µg/ml und/oder TTR-Konzentration <339,03 µg/ml. Testentscheidung negativ, wenn SAA-Konzentration <90,65 µg/ml und TTR-Konzentration >339,03 µg/ml.

Aus dieser Vierfeldertafel konnte für den Test eine Sensitivität von 90% und eine Spezifität von 53,57% errechnet werden. Der positive Vorhersagewert lag bei 67,50%, der negative Vorhersagewert bei 83,33%.

In einem zweiten Schritt war die Testentscheidung positiv, wenn sowohl die SAA-Konzentration größer als 90,65µg/ml als auch die TTR-Konzentration kleiner als 339,03µg/ml war. Die zugehörigen Werte sind in Tabelle 17 dargestellt.

Test	metastasiert	nicht-metastasiert	gesamt
positiv	18	4	22
negativ	12	24	36
gesamt	30	28	58

Tabelle 17: Vierfeldertafel der klarzelligen NZK mit der Metastasierung als Gruppierungsmerkmal. Testentscheidung positiv, wenn SAA-Konzentration $>90,65 \mu\text{g/ml}$ und TTR-Konzentration $<339,03 \mu\text{g/ml}$. Testentscheidung negativ, wenn SAA-Konzentration $<90,65 \mu\text{g/ml}$ und/oder TTR-Konzentration $>339,03 \mu\text{g/ml}$.

Die für diesen Test errechnete Sensitivität betrug 60%, die Spezifität 85,71%. Der positive Vorhersagewert lag bei 81,82%, der negative Vorhersagewert bei 83,33%.

3. Serum Amyloid Alpha im postoperativen Verlauf nach Tumornephrektomie

Bei 56 Patienten wurde die SAA-Konzentration vor der Operation gemessen. Danach erfolgten im optimalen Fall fünf weitere Messungen zu unterschiedlichen Zeitpunkten. Mit dem Wilcoxon-Test wurden die Werte zu den verschiedenen Zeitpunkten auf Signifikanz getestet. In Tabelle 18 sind die Mediane und Mittelwerte der Konzentrationen zu den unterschiedlichen Zeitpunkten aufgelistet.

Zeitpunkt	N	Konzentration [µg/ml]	
		Median	Mittelwert
präoperativ (N=56)	56	53	277
1.Tag post-op (N=34)	34	1094	1194
7.Tag post-op (N=36)	36	450	691
1.-3. Monat post-op (N=17)	17	52	63
4.-7. Monat post-op (N=15)	15	97	101
>7.Monat post-op (N=8)	8	90	98

Tabelle 18: Mediane und Mittelwerte der SAA- Konzentration bei Patienten nach Tumornephrektomie zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Operation in µg/ml

Allgemein konnte festgestellt werden, dass die Konzentrationen am ersten postoperativen Tag mit median 1094µg/ml deutlich höher waren, als vor der Operation (Median 53µg/ml) und am siebten Tag nach der Operation (Median 450µg/ml). Dies wird in Abbildung 13 noch einmal grafisch veranschaulicht. Für die 34 Patienten, die am ersten postoperativen Tag gemessen wurden, zeigten sich gegenüber ihren präoperativen Werten, mit median 38µg/ml, signifikant höhere Konzentrationen ($p=0,000$). Auch die Patientengruppe, die am siebten Tag nach Operation gemessen wurde, zeigte dies ($p=0,000$). Für die Patienten, bei denen zwischen dem ersten bis dritten Monat (Median 52µg/ml), vierten bis siebten Monat (Median 97µg/ml) und oberhalb des siebten Monats (Median 94µg/ml) eine Messung durchgeführt wurde, konnte gegenüber dem präoperativen Wert mit $p=0,243$, $p=0,391$ und $p=1,000$ keine Signifikanz mehr festgestellt werden. Beim Vergleich der Patienten, die sowohl am ersten als auch am siebten Tag nach Operation gemessen wurden (Median 1068µg/ml bzw. 292µg/ml) zeigte sich ein signifikanter Unterschied ($p=0,001$). Erfolgte eine Messung zwischen dem ersten bis dritten Monat, im median 71µg/ml, war der Wert signifikant niedriger ($p=0,006$) als am siebten postoperativem Tag (Median 251µg/ml). Zwischen dem ersten bis dritten Monat

(Median 37 μ g/ml) und dem vierten bis siebten Monat (Median 0.6 μ g/ml) konnte keine Signifikanz gemessen werden ($p=0,313$). Ein Vergleich der Werte von Patienten zum zweiten Nachsorgezeitpunkt gegenüber dem Messwert oberhalb des siebten Monats nach Operation war aufgrund der geringen Patientenzahl ($N=2$) nicht möglich. Die Aufstellung der einzelnen p-Werte ist in Tabelle 19 zu finden.

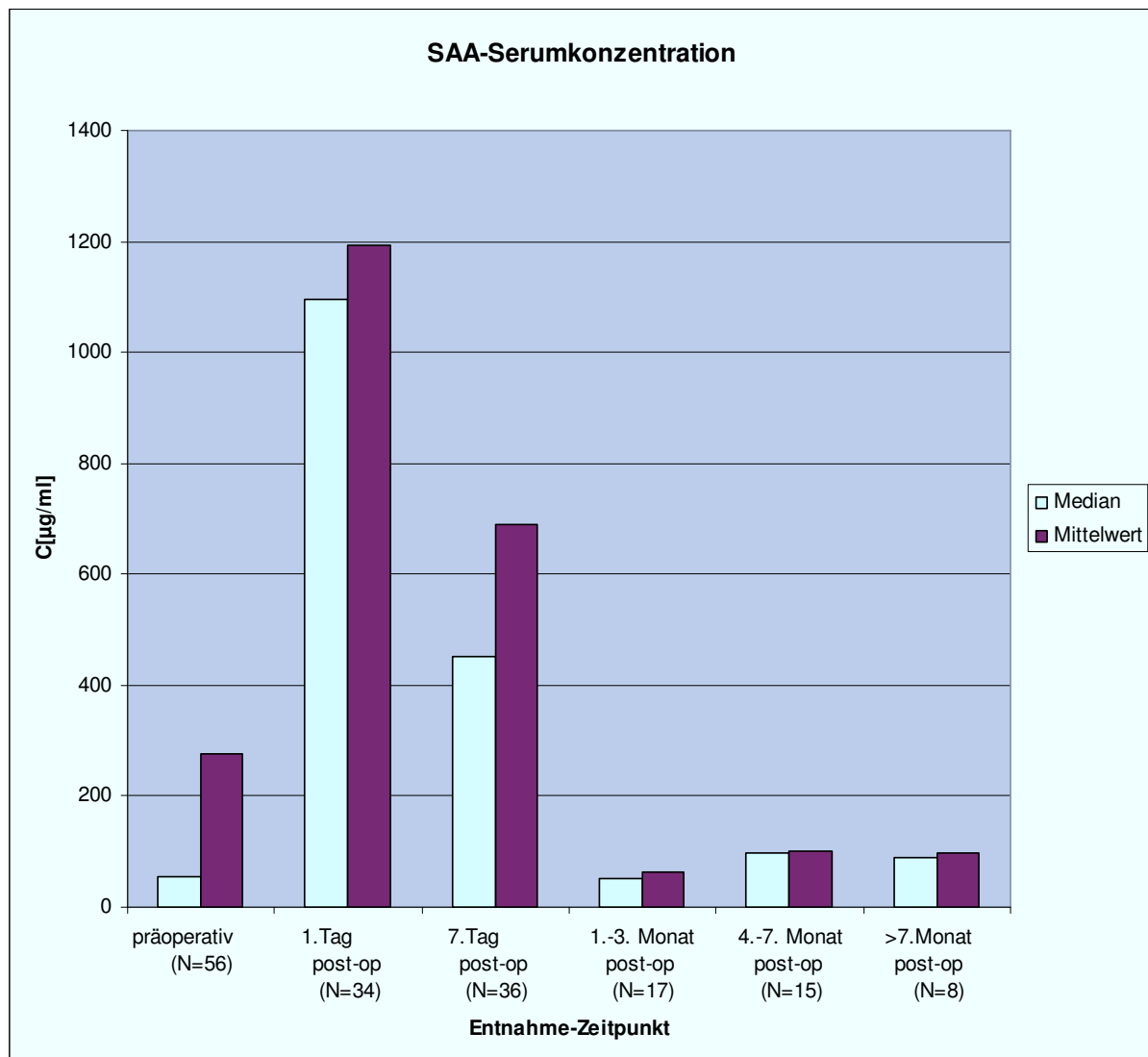


Abbildung 13: Balkendiagramm mit Darstellung der Mediane und Mittelwerte der SAA-Konzentration bei Patienten nach Tumornephrektomie zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Operation in μ g/ml

Gruppe	1.Tag post-op	7.Tag post-op	1.-3. Monat post-op	4.-7. Monat post-op	>7.Monat post-op
präoperativ	0,000 (N=34)	0,000 (N=36)	0,243 (N=17)	0,391 (N=15)	1,000 (N=8)
1.Tag post-op	-	0,001 (N=32)		-	-
7.Tag post-op	0,001 (N=32)	-	0,006 (N=10)	-	-
1.-3. Monat post-op	-	0,006 (N=10)	-	0,313 (N=6)	-
4.-7. Monat post-op	-	-	0,313 (N=6)	-	N=2
>7.Monat post-op	-	-	-	N=2	-

Tabelle 19: Kreuztabelle der p-Werte beim Vergleich der SAA-Konzentrationen zu den unterschiedlichen Zeitpunkten vor und nach Tumornephrektomie

Beim Vergleich der präoperativen Ausgangswerte (Median 53 $\mu\text{g/ml}$) mit den Nachsorgewerten zum Zeitpunkt von 4 bis 7 Monaten (Median 97 $\mu\text{g/ml}$) bzw. mehr als 7 Monate (Median 90 $\mu\text{g/ml}$) postoperativ fanden sich, wie oben bereits beschrieben, keine signifikanten Unterschiede. Bei einer Einzelbetrachtung zeigte sich, dass 10 der 15 Patienten zum 2. Nachsorgezeitpunkt geringere Konzentrationen und die restlichen 5 Patienten höhere Konzentrationen als präoperativ aufwiesen (Abbildung 14). Beim 3. Nachsorgezeitpunkt fanden sich bei jeweils 4 von 8 Patienten geringere bzw. höhere Konzentrationen als präoperativ (Abbildung 15).

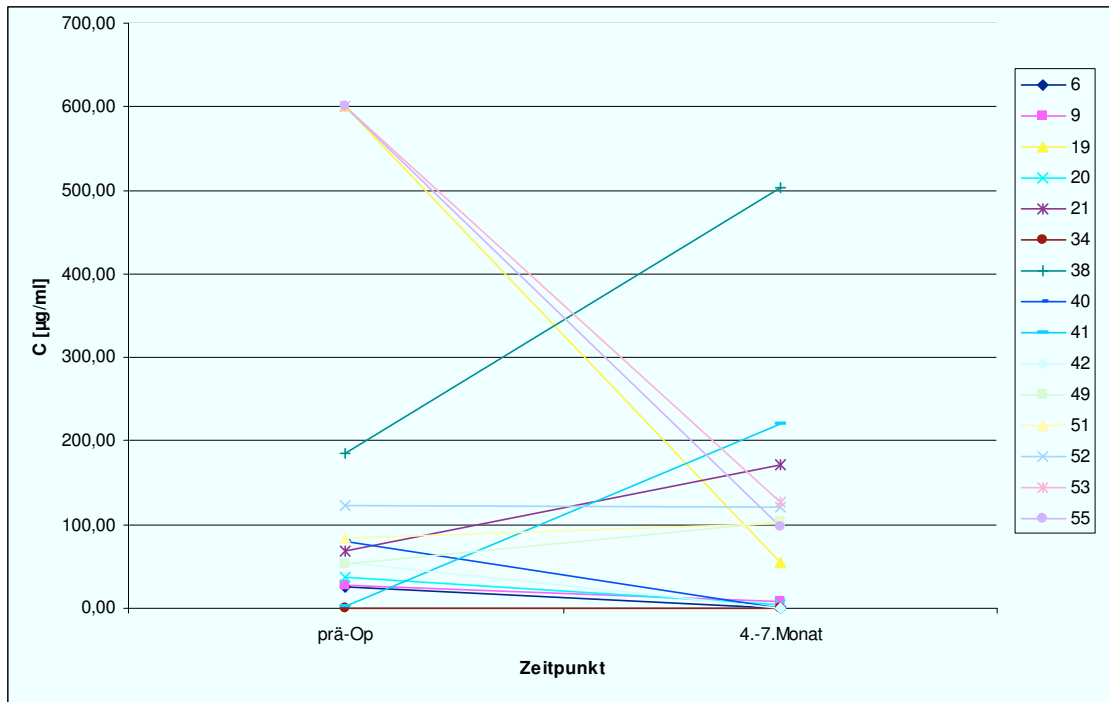


Abbildung 14: Diagramm mit Verlauf der SAA-Konzentration bei Patienten mit Nephrektomie im Vergleich des präoperativen Ausgangswertes mit den jeweiligen Nachsorgewerten zwischen dem 4.-7 Monat

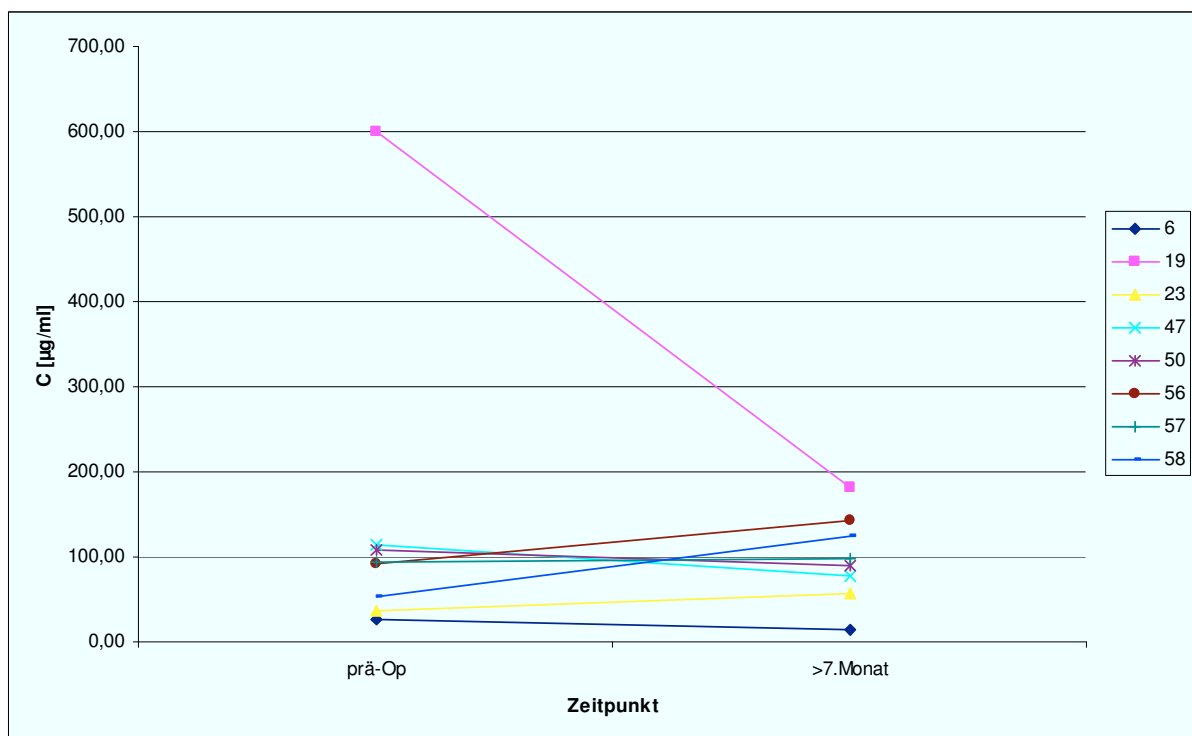


Abbildung 15: Diagramm mit Verlauf der SAA-Konzentration bei Patienten mit Nephrektomie im Vergleich des präoperativen Ausgangswertes mit den jeweiligen Nachsorgewerten nach mehr als 7 Monaten

Bei zwei Patienten, die zum 2. Nachsorgezeitpunkt zwar niedrigere Konzentrationen als präoperativ aufwiesen, stieg der Wert zum dritten Nachsorgetermin an, wenngleich weiterhin geringere Konzentrationen als präoperativ gemessen wurden.

Von diesen insgesamt 11 Patienten, bei denen ein tendenziell steigender SAA-Wert im postoperativen Verlauf gemessen wurde, zeigte sich in der Nachsorge nur bei einem Patienten eine Metastasierung. Diese trat noch im Jahr der Operation auf. Die restlichen 10 Patienten, bei denen keine Metastasen auftraten, wurden zwischen September 2009 und April 2010 zuletzt nachgesorgt.

4. SAA bei Harnblasenkarzinomen

Die SAA-Konzentrationen lagen in der Gruppen der Harnblasenkarzinome im median bei 25µg/ml und damit im Bereich der Werte des Kontrollkollektivs (Median 33µg/ml) und der Onkozytome (19µg/ml) und deutlich niedriger als die Werte der klarzelligen, papillären und chromophoben NZK, wie auch aus den Darstellungen in Tabelle 20 und Abbildung 16 hervorgeht.

Gruppe	Median	Mittelwert	Min	Max
Klarzellige NZK	115	364	19	2672
Papilläre NZK	92	219	23	1747
chromophobes NZK	54	209	28	1729
Onkozytom	19	38	2	171
Harnblasen-Ca	25	40	1	137
Kontrollen	33	38	2	194

Tabelle 20: SAA-Konzentrationen der einzelnen Subgruppen des Nierenzellkarzinoms, der Gruppe der Harnblasenkarzinome und des Kontrollkollektivs in µg/ml

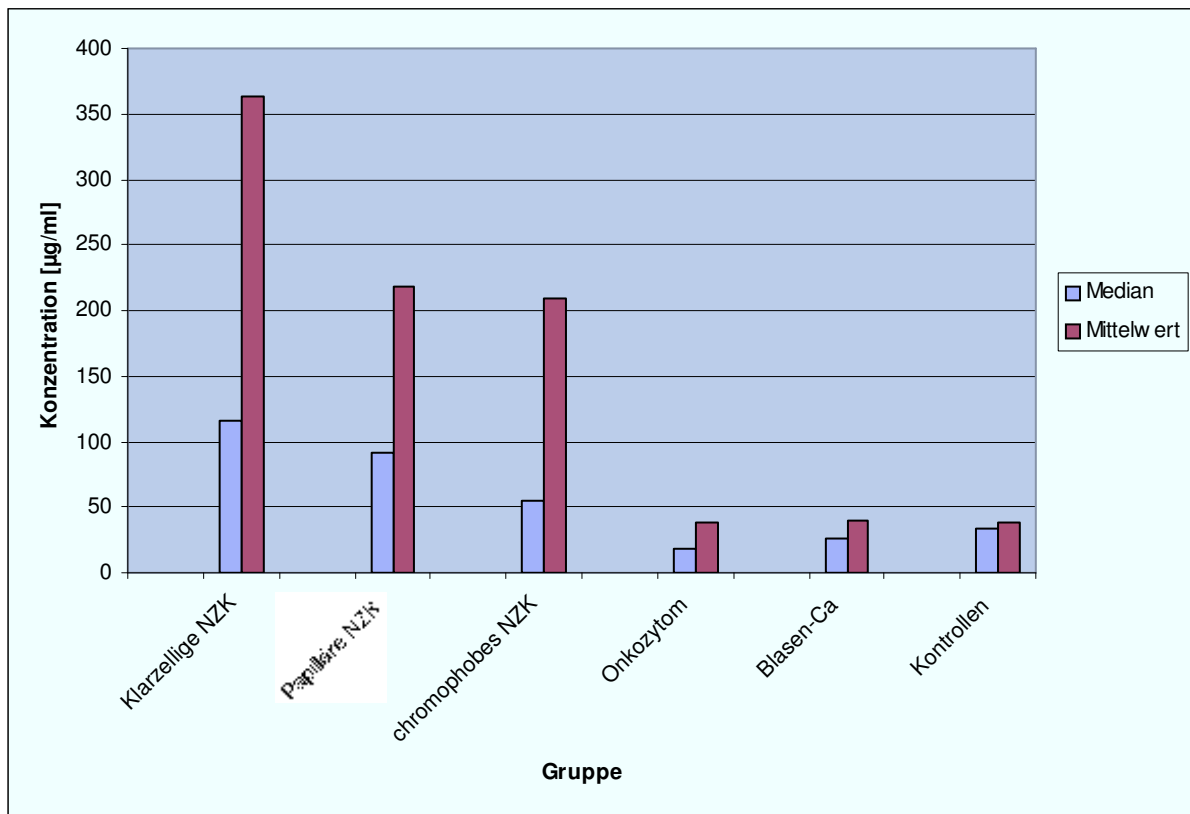


Abbildung 16: Balkendiagramm mit Darstellung der Mediane und Mittelwerte der SAA-Konzentration für die einzelnen Subgruppen des Nierenzellkarzinoms, der Gruppe der Harnblasenkarzinome und des Kontrollkollektives in µg/ml

So zeigten Patienten mit einem Harnblasenkarzinom auch keine signifikanten Unterschiede im Vergleich mit der Kontrollgruppe ($p=0,761$) und Patienten mit einem Onkozytom ($p=0,240$), während zu den malignen Nierentumoren in jeder Subgruppe signifikant niedrigere Konzentrationen dargestellt werden konnten, wie an den p-Werten in Tabelle 21 ablesbar ist.

Gruppe	klarzellig	met	nicht-met.	papillär	met	nicht-met	chromophob	onkozytär	Blasen	Kontrollen
klarzellig	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
met	-	0,001	0,006	-	-	0,004	0,000	0,000	0,000	0,000
nicht-met.	0,001	-	0,147	-	-	0,919	0,002	0,001	0,002	0,002
papillär	0,006	0,147	-	-	-	0,236	0,000	0,000	0,000	0,000
met	-	-	-	-	0,110	-	-	-	-	-
nicht met	-	-	-	0,110	-	-	-	-	-	-
chromophob	0,004	0,919	0,236	-	-	-	0,009	0,004	0,012	0,012
onkozytär	0,000	0,002	0,000	-	-	0,009	-	0,240	0,329	0,329
Blasen	0,000	0,001	0,000	-	-	0,004	0,240	-	0,761	0,761
Kontrollen	0,000	0,002	0,000	-	-	0,012	0,329	0,761	-	-

Tabelle 21: Kreuztabelle mit Darstellung der p-Werte im Vergleich der SAA-Konzentrationen der verschiedenen Gruppen untereinander

Innerhalb der Gruppe der Harnblasenkarzinome wurden zudem getestet, ob Unterschiede zwischen den T-Kategorien bestehen. So konnte zwischen pTa- (Median 26µg/ml), pT1- (Median 26µg/ml) und pT(2-4)-Tumoren (Median 22µg/ml) keinerlei Signifikanz gemessen werden, wie aus den p-Werten in Tabelle 22 ersichtlich ist. Mit dem Malignitätsgrad als Gruppierungsmerkmal konnten G2- (Median 25µg/ml) mit G3-Tumoren (Median 25µg/ml) verglichen werden, wo sich mit $p=0,820$ keine Signifikanz zeigte.

Gruppe	p-Wert
pTa vs. pT1	0,549
pTa vs. pT2-4	0,436
pT1 vs. pT2-4	0,400
G2 vs. G3	0,820

Tabelle 22: Darstellung der p-Werte beim Vergleich der SAA-Konzentrationen der Gruppe der Harnblasenkarzinome mit Grading und pT-Kategorie als Gruppierungsmerkmal

5. Nierentransplantation

5.1. Serum Amyloid Alpha

Für Patienten nach Nierentransplantation wurde untersucht, ob mit der Abstoßungsreaktion als Gruppierungsmerkmal Signifikanzen messbar waren. Die Konzentration mit median $140\mu\text{g/ml}$ bei der Gruppe mit einer Abstoßungsreaktion war dabei signifikant höher als in der Gruppe ohne Abstoßungsreaktion mit median $79\mu\text{g/ml}$ ($p=0,013$). Zudem war bei beiden Gruppen die Konzentration mit jeweils $p=0,000$ signifikant höher als in der Kontrollgruppe.

Es wurde eine ROC-Kurve mit Auftreten einer Abstoßungsreaktion als Gruppierungsmerkmal erstellt (siehe Abbildung 17). Daraus wurde ein Trennwert von $131,4\mu\text{g/ml}$ ermittelt. Dabei betrug die Sensitivität 57,7% und die Spezifität 86,7%. Der positive Vorhersagewert lag bei 79%, der negative Vorhersagewert bei 70,3%.

Aufgrund der niedrigen Sensitivität wurde ein weiterer Trennwert mit $104,52\mu\text{g/ml}$ ermittelt. Hierbei lag die Sensitivität bei 69,2% und die Spezifität bei 66,7%. Der positive Vorhersagewert betrug 64,3%, der negative Vorhersagewert 71,4%.

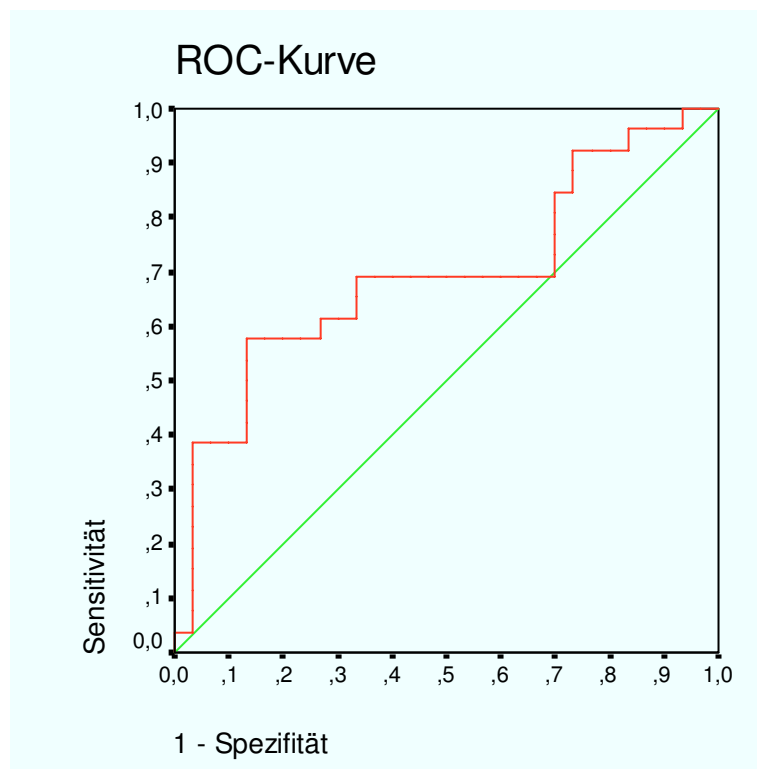


Abbildung 17: ROC-Kurve für Patienten nach Nierentransplantation mit Auftreten einer Abstoßungsreaktion als Gruppierungsmerkmal

5.2. Transthyretin

Beim Vergleich der Konzentrationen von Patienten nach Nierentransplantation wurden bei Solchen mit Abstoßungsreaktion im Median 383µg/ml, bei denjenigen ohne Abstoßungsreaktion im Median 315µg/ml gemessen, wobei dieser Unterschied nicht signifikant war ($p=0,082$). Daraufhin erfolgte der Vergleich aller Patienten mit Nierentransplantation (Median 360µg/ml) gegenüber der Kontrollgruppe (Median 452µg/ml). Hier hatte das Patientenkollektiv signifikant niedrigere Werte mit $p=0,002$.

V. Diskussion

In den letzten Jahren sind im Bereich der Onkologie zunehmend neue Medikamente verfügbar, die es erlauben, eine individuelle Therapiestrategie für Patienten nach dem Stadium ihrer Erkrankung zu entwickeln. Auch für das Nierenzellkarzinom stehen mit den Thyrosinkinaseinhibitoren und monoklonalen Antikörpern neue Therapeutika zur Verfügung, die eine Verbesserung der Prognose bei Patienten mit fortgeschrittener Erkrankung ermöglichen können. Um eine adäquate Bewertung von Therapiealternativen zu ermöglichen, scheint es daher sinnvoll, Biomarker zu entwickeln, die für spezifische Tumorsubtypen eine individuelle Überwachung nach Therapie sowie eine bessere Einschätzung des individuellen Metastasierungsrisikos erlauben.

Durch die vorangegangenen Analysen im Serum mittels SELDI-TOF-MS-Technologie konnten SAA und TTR als mögliche Kandidatenproteine ermittelt werden (Junker et al. 2009).

1. Nierenzellkarzinom

1.1. Serum Amyloid Alpha als Biomarker für Nierenzellkarzinome

Ausgehend von der Tatsache, dass es sich bei Nierenzelltumoren um eine heterogene Gruppe von Erkrankungen handelt, bei denen die verschiedenen Subtypen „spezifische chromosomale Muster“ aufweisen und somit auch unabhängige Tumorentitäten darstellen (Junker et al. 2006), wurde in der vorliegenden Arbeit besonderes Augenmerk auf eine differenzierte Betrachtung der SAA-Serumkonzentration für die einzelnen Subtypen gelegt.

Sowohl klarzelligen, als auch papillären und chromophoben NZK war gemeinsam, dass sie jeweils gegenüber der Kontrollgruppe und Patienten mit Onkozytom, einem benignen Nierentumor, signifikant höhere SAA-Konzentrationen aufwiesen. Dies ist insofern wichtig zu bemerken, da zum Beispiel bei Pankreasneoplasien der SAA-Spiegel keine Unterscheidung zwischen benignen und malignen Tumoren erlaubt (Firpo et al. 2009).

In der vorliegenden Arbeit konnte zudem gezeigt werden, dass die SAA-Konzentration mit dem Malignitätsgrad ansteigt und auch die lokale Ausdehnung des Tumors zu einer signifikanten Anstiegs des SAA führt. Ähnliches wurde in einige Studien zu anderen Tumorentitäten beschrieben. Darin wurde ein positiver Zusammenhang zwischen SAA-

Konzentration und Tumorstadium zum Einen für das Lungenkarzinom (Dai et al. 2007, Liu et al. 2007a) und zum Anderen für das Magenkarzinom (Chan et al. 2007) dargestellt. Es fanden sich in höheren Stadien auch höhere SAA-Werte.

Bei klarzelligen NZK konnten die höchsten Werte gemessen werden, wobei festgehalten werden muss, dass fortgeschrittene, bereits metastasierte Karzinome im Gegensatz zu den lokal begrenzten Tumoren und den papillären und chromophoben NZK signifikant höhere Konzentrationen aufwiesen.

Auch für das Prostatakarzinom konnte gezeigt werden, dass das Vorhandensein von Metastasen, im Speziellen von Knochenmetastasen, mittels SAA differenziert werden kann (Le et al. 2005). Zudem decken sich die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit mit einer Studie von 2008, in der SAA als Indikator für Fernmetastasen beim NZK beschrieben wurde (Ramankulov et al. 2008). Dort erfolgte die Gruppeneinteilung nach dem N- und M-Stadium, wobei die Gruppe der Patienten mit Fernmetastasen nahezu ausschließlich aus Karzinomen vom klarzelligen Typ bestand, während in die Gruppe der lokal begrenzten Tumoren auch Karzinome vom papillären und chromophoben Typ mit aufgenommen wurden. Somit kann man sagen, dass auch dort SAA vornehmlich bei metastasierten klarzelligen NZK stark erhöht war.

Beim papillären Subtyp nahmen fortgeschrittene Tumoren höhere Werte an, als die lokal begrenzten Tumoren. Hier stellte sich der Unterschied jedoch als nicht signifikant heraus. Allerdings nahm der Median für die lokal begrenzten papillären Tumore einen fast doppelt so hohen Wert an, als jener der lokal begrenzten klarzelligen Tumore. Für letztere lag zwar der Mittelwert deutlich höher gegenüber der Gruppe der papillären Tumore, was aber sehr wahrscheinlich auf einzelne sehr hohe Maximalwerte zurückzuführen ist. Zudem nahmen Mediane und Mittelwerte der fortgeschrittenen papillären Tumoren ähnlich hohe Werte an wie die der fortgeschrittenen klarzelligen Tumoren. Demnach kann durchaus vermutet werden, dass auch eine Metastasierung innerhalb des papillären Subtyps zu ausgeprägten SAA-Anstiegen führen kann, zumal in Betracht gezogen werden muss, dass durch die geringe Anzahl der eingeschlossenen Patienten (N=8) mit einem metastasierten papillären NZK im Vergleich mit der Gruppe der lokal begrenzten papillären NZK (N=20) ein Bias vorliegen könnte und bei einer größeren Gruppenstärke Signifikanzen zwischen diesen beiden Gruppen zu erwarten wären.

In der aktuellen Literatur findet sich, dass es chromosomale Veränderungen wie auch differenzierte Expressionsmuster bei NZK gibt, die sich zwischen lokal begrenzten und fortgeschrittenen Tumoren unterscheiden (Junker et al. 2009). Die Autoren berichten,

derartige Veränderungen seien vor allem bei Tumoren zu beobachten, die eine „Metastasierung innerhalb von zwei Jahren nach Primärtumorentfernung“ zeigten. Aus klinischen Beobachtungen ist bekannt, dass der Zeitpunkt des Auftretens der Metastasierung in Bezug zur Primärtumoroperation wesentlich mit der Prognose assoziiert ist.

In der vorliegenden Arbeit korrelierte die SAA-Konzentration im Serum nicht mit dem Metastasierungszeitpunkt, das heißt, beim Vergleich primärer gegen sekundäre und früher gegen späte Metastasierung konnten zwar Unterschiede gemessen werden, diese waren jedoch nicht signifikant. Allerdings konnten lediglich fünf Patienten eingeschlossen werden, bei denen die Metastasen später als 2 Jahre nach Primärtumorentfernung auftraten, also als späte Metastasierung eingestuft werden konnten.

Um eine sinnvolle Beurteilung von SAA als Biomarker zu ermöglichen, muss bemerkt werden, dass es drei Isoformen des SAA gibt. Während SAA-1 und -2 vor allem Akut-Phase-Proteine darstellen, wird SAA-4 konstitutiv als Cofaktor für HDL exprimiert (Urieli-Shoval et al. 1998). In den SELDI-TOF-MS-Untersuchungen zum NZK, Lungenkarzinom und Prostatakarzinom (Junker et al. 2006, Dai et al. 2007, Chan et al. 2007, Le et al. 2005) wurde SAA-1 als erhöht identifiziert. Somit steht die Frage im Raum, welche Affinität die gängigen SAA-ELISA-Kits zu den einzelnen Isoformen besitzen und damit wie spezifisch die Messungen der Serumwerte für SAA-1 erfolgen können. Es ist durchaus möglich, dass ein Teil der gemessenen SAA-Konzentrationen auch auf die anderen beiden Isoformen zurückzuführen ist.

Eine weitere kontrovers diskutierte Frage ist, ob die erhöhten SAA-Serumwerte durch lokale Produktion der Tumorzellen zustande kommen. Möglicherweise produzieren Tumoren Mediatoren, wodurch die SAA-Freisetzung aus der Leber gesteigert wird (Gutfeld et al. 2006). Andererseits konnte eine SAA-Expression in einer Vielzahl von Geweben nachgewiesen werden, vorzugsweise in deren epithelialen Anteilen. Dazu gehörten neben Brust-, Lunge- und Prostata- auch Nierengewebe, sowie Endothelzellen (Urieli-Shoval et al. 1998). Ob es sich dabei um eine bestimmte SAA-Isoform handelt, ist nicht beschrieben, wenngleich dass SAA-4 auf Grund seiner Assoziation mit HDL als wahrscheinlicher Kandidat anzusehen ist. Es erscheint also durchaus möglich, dass auch Tumoren der oben aufgezählten Gewebe SAA produzieren können. Ob dieses dann auch ins Blut abgegeben einen so ausgeprägten Anstieg, wie beobachtet wurde, zu verursachen im Stande ist, erscheint unwahrscheinlich. Das lokale SAA steht allerdings im Verdacht, die Adhäsion von Tumorzellen zu modulieren (Malle et al. 2009) bzw. die lokale Tumorausbreitung zu begünstigen (Michaeli et al. 2008).

Für diese These spricht auch eine neue Studie, in der Paret et al. beschreiben, dass vor allem bei Patienten mit einem metastasierten klarzelligen NZK im Vergleich zu anderen Entitäten des NZK die SAA1-RNA-Expression erhöht war. Zudem bestehe zwischen der SAA1-RNA-Expression und dem klinischen Outcome eine positive Korrelation (Paret et al. 2009)

Ähnliches wurde auch für das Kolonkarzinom beschrieben (Gutfeld et al. 2006). So beobachteten die Autoren, dass sowohl die SAA-mRNA- als auch SAA-Protein-Expression im Verlauf der Dysplasie-Karzinom-Sequenz in den betroffenen Zellen zunimmt.

Trotz einiger offener Fragen muss man festhalten, dass in der vorliegenden Arbeit deutlich erhöhte SAA-Werte im Serum gemessen wurden und dass diese insbesondere bei aggressiven Formen wie den fortgeschrittenen klarzelligen und papillären NZK auftraten. Dieses Phänomen wird in der aktuellen Literatur auch bei einer Reihe anderer Tumoren beschrieben. Es sind somit weitere Untersuchungen nötig, um die Herkunft des SAA-1 bei Tumorkranken zu klären.

1.2. Transthyretin als Biomarker für Nierenzellkarzinome

Wie unter 1.1. bereits erläutert, handelt es sich bei NZK um eine heterogene Gruppe von Tumoren, weshalb auch für das TTR, analog zum SAA, eine differenzierte Betrachtung unter Berücksichtigung des Subtyps erfolgen muss.

Zunächst muss festgehalten werden, dass die TTR-Serumkonzentrationen bei allen Nierenzelltumoren inklusive der Onkozytome als benignen Tumor signifikant niedriger waren als in der Kontrollgruppe. Dies entspricht insofern den Erwartungen, da TTR als Anti-Akut-Phase-Protein bei Stress-Stimuli, wie ihn Tumoren darzustellen scheinen, entgegengesetzt den Akut-Phase-Proteinen wie zum Beispiel SAA reagieren. TTR wird hauptsächlich in der Leber gebildet und ist am Transport von Thyroxin und Trijodthyronin und über das RBP am Transport von Vitamin A beteiligt. Ein Absinken im Serum kann durch Stress im Allgemeinen bedingt sein, ist aber vor allem bei Mangelernährung der Fall (Ingenbleek und Young 1994).

In den Messungen stellte sich zudem heraus, dass mit einer Zunahme des Malignitätsgrades der NZK auch die TTR-Konzentration signifikant abnahm. Dies wurde in der Literatur für NZK bisher noch nicht beschrieben.

Als weitere Besonderheit fiel auf, dass bei den Onkozytomen deutlich niedrigere TTR-Konzentrationen gemessen wurden, die auch signifikant waren, als bei den klarzelligen und

chromophoben NZK. Ein ähnlicher Unterschied für das TTR zwischen einem Karzinom und einer benignen Erkrankung wird in der Literatur beim Lungenkarzinom beschrieben (Liu et al. 2007b). Auch hier war die TTR-Konzentration im Serum in der Gruppe der Karzinome und bei benignen Lungenerkrankungen gegenüber der Kontrollgruppe niedriger und die Werte nahmen für benigne Lungenerkrankungen noch geringere Werte gegenüber den Karzinomen an.

In der vorliegenden Arbeit fanden sich die niedrigsten Werte bei den papillären NZK. Sowohl bei den klarzelligen als auch bei den papillären Tumoren fanden sich zudem signifikante Unterschiede zwischen lokal begrenzten und fortgeschrittenen Stadien. Auffällig war dabei nicht nur, dass im Gegensatz zum SAA diese Unterscheidung auch bei den papillären Tumoren signifikant war, sondern dass deren Werte im Vergleich zu den klarzelligen NZK noch niedriger waren.

Bei den klarzelligen fortgeschrittenen NZK wurde untersucht, ob Konzentrationsunterschiede bezüglich des Metastasierungszeitpunktes existieren. Sowohl beim Vergleich primärer gegen sekundäre und früher gegen späte Metastasierung fanden sich keine signifikanten Unterschiede. Allerdings muss auch hier noch einmal angemerkt werden, dass die Gruppen der primär (N=7) und spät metastasierten (N=5) Tumoren nur niedrige Patientenzahlen aufwiesen, wenngleich die p-Werte mit 0,945 und 0,359 auch sehr deutlich mögliche Unterschiede ausschließen. Eine Korrelation zur lokalen Ausdehnung der Tumoren konnte nicht festgestellt werden, anders allerdings beim Malignitätsgrad. Hier hatten Tumoren, die als G3 eingestuft wurden signifikant niedrigere TTR-Konzentrationen im Serum, als G2-Tumoren. Dies wurde bisher als Solches in der Literatur noch nicht beschrieben.

Mittels ROC-Kurve wurde für die Gruppe der klarzelligen NZK ein Trennwert errechnet, der eine Differenzierung anhand der Metastasierung ermöglichen sollte. Dieser Trennwert besaß eine gute Spezifität, bei einer relativ geringen Sensitivität.

Auf Grund der sehr niedrigen TTR-Konzentrationen bei den papillären NZK und dem signifikanten Unterschied zwischen lokal begrenzten und fortgeschrittenen Tumoren wurde auch hier mittels ROC-Kurve versucht, einen Trennwert zu bestimmen. Bei 196,8µg/ml konnten die besten Ergebnisse für die Sensitivität mit 87,5% und die Spezifität mit 75% ermittelt werden. Dennoch muss man hier erwähnen, dass die Patientenzahl der fortgeschrittenen papillären NZK mit N=8 nicht sehr hoch war. Auch war für das SAA solch ein Vergleich nicht möglich. Trotzdem geben die Ergebnisse für das TTR durchaus Anlass den Zusammenhang mit einer höheren Gruppenstärke noch einmal, auch für das SAA, zu

untersuchen, zumal dort trotz mangelnder Signifikanz eine ähnliche Tendenz zu erkennen war.

In verschiedenen Arbeiten konnte TTR mittels immunhistochemischer Untersuchungen in Nierengewebe nachgewiesen werden. Hier wurde sowohl im gesunden Nierengewebe als auch im Tumorgewebe TTR gefunden (Ang et al. 1991, Giordano et al. 1996). In einer weiteren Studie wurde TTR lediglich im proximalen Tubulusepithel bei gesunden Probanden gefunden, nicht aber bei NZK (Jacobsson et al. 1995). Zudem beschrieben die Autoren, weder in gesunden Zellen noch in Tumorzellen TTR-mRNA nachweisen zu können. Daraus schlussfolgerten sie, das nachgewiesene TTR in den Tubuluszellen der gesunden Niere werde dort nicht produziert, sondern durch Reabsorption aus dem Urin aufgenommen.

Beim Lungenkarzinom wurde TTR ebenfalls immunhistochemisch in Karzinomzellen nachgewiesen, nicht aber im Lungenstroma und in nicht-malignem Lungengewebe (Liu et al. 2007b). Interessanterweise fanden sich in den dortigen Untersuchungen bei benignen Lungenerkrankungen noch einmal deutlich geringere Werte gegenüber den Karzinomen. Als Erklärung formulierten die Autoren, dass bei beiden Lungenerkrankungen die TTR-Produktion in der Leber vermindert werde, TTR aber möglicherweise in den Karzinomzellen exprimiert und in das Serum abgegeben würde.

Ähnlich wie beim SAA wurden auch für das TTR bei Untersuchungen mit SELDI-TOF MS modifizierte Formen gefunden. So beim Lungenkarzinom (Liu et al. 2007b), bei Ovarialkarzinomen (Moore et al. 2006, Kozak et al. 2005, Zhang et al. 2004) und Mycosis fungoides (Escher et al. 2007). Somit kann auch hier, analog zum SAA, nur durch den Einsatz von ELISA, die spezifisch für die einzelnen Formen sind, deren Wertigkeit im Hinblick auf eine differenzierte Betrachtung der Tumortypen evaluiert werden.

1.3. Nutzen der Kombination aus Serum Amyloid Alpha und Transthyretin als Biomarker für Nierenzellkarzinome

In der vorliegenden Arbeit konnten sowohl für SAA als auch für TTR signifikante Unterschiede zwischen den lokal begrenzten und fortgeschrittenen klarzelligen NZK ermittelt werden. Daraufhin wurden für beide Proteine mit Hilfe von ROC-Kurven Trennwerte ermittelt. Beim SAA konnte ein Wert mit einer guten Sensitivität (86,7%) ermittelt werden, wobei die Spezifität nicht als optimal angesehen werden kann. Für das TTR war umgekehrt eine gute Spezifität (78,6%) berechnet worden. Daraus wird deutlich, dass durch Betrachtung

einzelner Proteine die prognostische Aussagekraft eingeschränkt ist. Diese sollte durch die Kombination von SAA und TTR erhöht werden. So stieg, wenn wenigstens einer der beiden Trennwerte über- bzw. unterschritten wurde, die Sensitivität auf 90% an, während die Spezifität sich mit 53,57% gegenüber den Einzelwerten verringerte. Postulierte man die Testentscheidung nur als positiv, wenn beide Trennwerte eingehalten wurden, verbesserte sich zwar die Spezifität, aber unter Abnahme der Sensitivität. Allerdings ließen sich dadurch sehr gute positive (81,82%) und negative Vorhersagewerte (83,33%) erzielen.

Erwartungsgemäß ließ sich somit die Aussagekraft bei gemeinsamer Betrachtung der beiden Proteine verbessern, wenngleich durch die geringe Spezifität die Gefahr der Überdiagnostik als hoch eingeschätzt werden muss. Dennoch ist zu sagen, dass gerade bei klarzelligen NZK die Prognose entscheidend von der frühzeitigen Entdeckung einer Metastasierung abhängig ist, und somit die Diskussion bezüglich Überdiagnostik und Übertherapie differenziert geführt werden muss.

Bemerkenswert ist, dass für papilläre NZK beim TTR ein Trennwert mit sehr guter Sensitivität bei ebenfalls guter Spezifität errechnet wurde. Hier erscheint es durchaus möglich, dass die Kombination von TTR und SAA noch eine deutlich bessere Aussagekraft erzielen kann, als beim klarzelligen NZK. Dazu sei auch auf 1.2. verwiesen.

In der Literatur werden sowohl für SAA als auch TTR bei verschiedenen Tumoren Algorithmen beschrieben, die sich aus verschiedenen Proteinen und Einflussfaktoren zusammensetzten. Durch diese Algorithmen ließen sich bessere Vorhersagen treffen, als durch die Verwendung einzelner Biomarker. Beim Ovarialkarzinom wurde in drei unabhängigen Studien beschrieben, dass die Kombination von CA125 mit anderen Proteinen, darunter TTR, bessere Ergebnisse in der Entdeckung von frühen Stadien des Tumors erzielt, als CA125 alleine (Moore et al. 2006, Zhang et al. 2004, Kozak et al. 2005). Ähnliches wird für das SAA beim Pankreaskarzinom (Firpo et al. 2009) und Malignem Melanom (Findeisen et al. 2009) beschrieben. So konnten die Autoren mit einem Diagnose-Panel aus SAA, Haptoglobin und CA19-9 die Spezifität und Sensitivität bei der Differenzierung zwischen benignem und malignem Tumor des Pankreas gegenüber CA19-9 alleine erhöhen. Beim malignen Melanom postulierten die Autoren, dass die Kombination aus SAA und CRP in frühen Stadien helfen kann, zwischen Niedrig- und Hoch-Risiko-Patienten zu unterscheiden.

Da sowohl die SAA- als auch TTR-Serumkonzentration aber als Akut- bzw. Anti-Akut-Phase-Proteine einer Reihe von allgemeinen Einflussfaktoren wie Stress oder Infekten unterliegen, erscheint es nicht sinnvoll, sie im Sinne eines Diagnose-Panels zur Früherkennung von NZK einzusetzen. Vielmehr, so auch in dieser Arbeit dargestellt und wie

oben für andere Tumoren beschrieben, eignen sie sich bei Entdeckung eines Nierentumors zu einer Einschätzung bezüglich des malignen Potentials bzw. nach erfolgter histologischer Klassifizierung zu einer Risikoabschätzung der Metastasierung.

Dies ermutigt dazu, weiter an der Identifizierung und Entwicklung von Biomarkern für das NZK zu arbeiten, da es möglicherweise einer größeren Anzahl an Markern bedarf, um eine sehr gute Aussagekraft treffen zu können und somit im Sinne des Patienten zu handeln. SAA und TTR können dabei als Basis für weitere Untersuchungen genutzt werden, wenngleich der Einfluss von Isoformen beim SAA und modifizierten Formen beim TTR auf den Serumspiegel noch unklar ist und es spezifischer ELISA bedarf, um Erklärungen dazu zu liefern.

2. Serum Amyloid Alpha als Biomarker bei Patienten nach Tumornephrektomie

In der vorliegenden Arbeit wurde unter anderem die Fragestellung untersucht, wie sich SAA nach einer Tumornephrektomie verhält, die aktuell bei lokal begrenzten Tumoren die Therapie der Wahl darstellt. Wie erwartet stiegen die Werte nach der Operation als Trauma- und Entzündungsstimulus stark an. So waren auch am siebten Tag nach Operation noch signifikant höhere SAA-Werte als präoperativ im Serum zu messen, die allerdings im Vergleich zum ersten postoperativen Tag bereits signifikant niedriger waren. Die Abnahme der Werte zeigte sich auch bei der nächsten Messung zwischen dem ersten und dritten Monat nach Operation. Im weiteren Verlauf konnten jedoch keine weiteren signifikanten Veränderungen mehr beobachtet werden. Außerdem fielen zu keinem der drei Nachsorgezeiträume (erster bis dritter Monat, vierter bis siebter Monat und oberhalb des siebten Monats nach Operation) die SAA-Konzentrationen im Serum signifikant unter die präoperativen Ausgangswerte ab. Vielmehr lag der Median zum zweiten und dritten Nachsorgetermin höher als präoperativ bzw. auf etwa dem gleichen Niveau. Allerdings muss festgehalten werden, dass bei einer Einzelbetrachtung der Fälle 2/3 der Patienten zum zweiten Nachsorgetermin niedrigere Konzentrationen als präoperativ aufwiesen. Interessanterweise konnte bei dem Drittel der Patienten, die erhöhte Werte aufwiesen, in der gesamten Nachsorge keine Metastasierung festgestellt werden. Dass trotz allem keine Signifikanz gemessen wurde, kann auf die sehr große Varianz der Konzentrationen mit teilweise sehr hohen Werten zurückgeführt werden. Zudem zeigten von den acht Patienten zum letzten Nachsorgetermin zwei Patienten im Verlauf eine Metastasierung wobei bei diesen Patienten

die gemessene Konzentration unterhalb des präoperativen Ausgangswertes lag. Allerdings konnte bei einem der beiden Patienten eine Verdopplung der Konzentration im Vergleich zur vorherigen Nachsorge zwischen dem vierten bis siebten Monat festgestellt werden. Bei den anderen Patienten mit erhöhten Werten fand sich in der gesamten Nachsorge kein Anhalt für eine Metastasierung. Der postoperative Verlauf war insofern anders erwartet worden, da vermutet wurde, durch die Operation den Tumor als Auslöser des erhöhten SAA-Spiegels beseitigen zu können und somit postoperativ einen deutlichen Abfall der SAA-Konzentrationen im Verlauf beobachten zu können. Ein mögliches Erklärungsmodell für dieses Verhalten wäre das Auftreten von Metastasen gewesen, wobei nur bei zwei von elf Patienten, mit erhöhten Werten gegenüber dem Ausgangswert, dieser Fall eintrat. Natürlich ist es durchaus möglich, dass bei den übrigen Patienten Metastasen klinisch noch nicht manifest waren, allerdings befinden sich diese Patienten auch aktuell noch in klinischer Nachsorge, die mittlerweile zwischen zwei und drei Jahren beträgt. Somit ist es möglich, dass die starken Konzentrationsschwankungen des SAA möglicherweise auch auf allgemeine Entzündungsstimuli wie einen Infekt oder Stress zurückgeführt werden könnten.

Angemerkt werden muss, dass die Patientenzahlen zu den verschiedenen Messzeitpunkten sehr unterschiedlich waren. So konnten die präoperativen Werte von insgesamt 56 Patienten gemessen werden, bei den Nachsorgezeitpunkten lag die Stärke des Messkollektivs zwischen 8 und 17 Patienten. Eine weiterreichende Aussage wäre möglich, wenn von allen Patienten der präoperativen Messung auch alle Nachsorgemessungen und die weitere klinische Verlaufskontrolle möglich gewesen wären. Dennoch bleibt festzuhalten, dass der initiale starke SAA-Anstieg am ersten postoperativen Tag bereits bei Patienten mit Kolonkarzinom nach Kolektomie beschrieben wurde (Glojnaric et al. 2001). Anders als in der vorliegenden Arbeit, fielen in dieser Studie die Werte unter die präoperativen Ausgangswerte ab, wenngleich keine normalen Werte erreicht wurden. Allerdings muss angemerkt werden, dass dieser Abfall unter adjuvanter Chemotherapie erfolgte, während in der vorliegenden Arbeit die operative Tumorentfernung die alleinige Therapie blieb. Dennoch erscheint es sinnvoll, in einer prospektiven Studie, mit höheren Fallzahlen und langen Nachbeobachtungszeiträumen den postoperativen Verlauf nach Tumornephrektomie weiter zu untersuchen und dabei auch eine Differenzierung zwischen Tumorsubtypen vorzunehmen. So ist es durchaus möglich, dass in der vorliegenden Arbeit Patienten bei den späten Nachsorgezeitpunkten oder eventuell auch schon vor Operation bereits Metastasen hatten, die klinisch noch nicht manifest waren und somit zu einer Verzerrung der Ergebnisse führen könnten.

3. Serum Amyloid Alpha als Biomarker bei Harnblasentumoren

Wie unter 1.1. bereits diskutiert, wurden Veränderungen des SAA-Serum-Spiegels bereits bei einer Reihe Tumoren anderer Organe, wie Lunge, Magen, Darm oder Prostata beobachtet. In der vorliegenden Arbeit wurde SAA bei Patienten mit Harnblasenkarzinomen als weiterem urologischem Tumor untersucht. Hier fanden sich in den Messungen allerdings keine signifikanten Unterschiede beim Vergleich der Harnblasentumoren mit der Kontrollgruppe. Auch fortgeschrittene Tumoren im Stadium T2-4 zeigten keine statistisch messbaren Unterschiede zu lokal begrenzten Tumoren im Stadium Ta. Deshalb sei auch hier noch einmal angemerkt, dass SAA-Veränderungen bei Tumoren nicht regelhaft auftreten, auch wenn es sich hier um eine sekundäre, möglicherweise unspezifische Reaktion handelt. So konnten für Harnblasentumoren keinerlei SAA-Anstiege beobachtet werden, auch nicht für große Tumoren, bei denen eine Metastasierung wahrscheinlich ist.

4.1. Serum Amyloid Alpha als Prädiktor einer Abstoßungsreaktion nach Nierentransplantationen

In vorangegangenen SELDI-TOF-MS-Untersuchungen fanden sich im Rahmen der Nierentransplantation erhöhte SAA-Werte, weshalb in dieser Arbeit eine quantitative Bestimmung der SAA-Konzentrationen für diese Patienten mittels ELISA erfolgte.

Sowohl bei Patienten mit und ohne Abstoßungsreaktion wurden wesentlich höhere Serumkonzentrationen gemessen als bei der Kontrollgruppe. Dies deckt sich insofern mit den Erwartungen, da SAA als Akut-Phase-Protein in der Leber vor allem in Folge von Traumata, Infektionen und Entzündungen vermehrt produziert wird (Nakayama et al. 1993, Urieli-Shoval et al. 2000) und die Transplantation als Solches als Stimulus der vermehrten SAA-Produktion angesehen werden muss, wobei eine Abstoßungsreaktion diesen Stimulus zusätzlich verstärken wird. Allerdings waren die Werte im Vergleich mit fortgeschrittenen klarzelligen NZK und den postoperativen Werten nach Tumornephrektomie deutlich niedriger. Es ist möglich, dass dies durch die immunsuppressive Therapie bedingt ist, welche die Bildung von SAA als Akut-Phase-Protein vermindert.

Weiterhin zeigten Patienten mit Abstoßungsreaktion deutlich höhere Werte als Patienten ohne Abstoßungsreaktion. Dieser Unterschied war zudem signifikant.

Mittels ROC-Kurven wurden für die beiden Gruppen jeweils Trennwerte errechnet, mit denen eine Abgrenzung zur Kontrollgruppe möglich war. So zeigte sich, dass die jeweiligen errechneten Trennwerte nahezu gleich waren. Auch die jeweilige Spezifität und Sensitivität nahmen fast die gleichen Werte an. Wichtiger ist jedoch, einen Trennwert zu ermitteln, mit dem eine Unterscheidung zwischen den beiden Gruppen erzielt werden kann. Zunächst wurde mit 131,4µg/ml ein Wert an der ROC-Kurve bestimmt, der sich aus statistischer Sicht als optimal darstellte, bei dem die Sensitivität 57,7% und die Spezifität 86,7% betrug. Aus diagnostischer Sicht ist diese geringe Sensitivität klinisch allerdings unbrauchbar, weshalb ein Wert von 104,52µg/ml ermittelt wurde, wobei sich die Sensitivität auf 69,2% erhöhte während die Spezifität erwartungsgemäß absank und bei 66,7% lag. Diese Ergebnisse decken sich mit einer Studie von 1997, bei der SAA als Prädiktor für das Auftreten einer Abstoßungsreaktion nach Nierentransplantation ermittelt wurde (Hartmann et al. 1997). Somit kann festgehalten werden, dass SAA mit einem positiven Vorhersagewert von 64,3% und einem negativen Vorhersagewert von 71,4% als ergänzendes diagnostisches Werkzeug nutzbar ist.

4.2. Transthyretin als Prädiktor einer Abstoßungsreaktion nach Nierentransplantationen

Wie für das SAA untersuchte die vorliegende Arbeit auch die Aussagekraft von TTR bezüglich der Nierentransplantation. Hier zeigten sich beim Vergleich der Patienten mit und ohne Abstoßungsreaktion keine signifikanten Unterschiede. Allerdings waren die TTR-Konzentrationen im Serum der Gesamtgruppe signifikant niedriger als die der Kontrollgruppe. Dies ist insofern bemerkenswert, da solch ein Zusammenhang in der aktuellen Literatur nicht beschrieben wird. Vielmehr hatten Patienten in diesen Studien bei verschiedenen Nierenerkrankungen, wie chronischer Niereninsuffizienz mit und ohne Dialysepflichtigkeit und eben Nierentransplantationen normale Serum-TTR-Werte (Cano 2002, Fella et al. 2008). Lediglich bei Mangelernährung und Entzündungen waren die Werte abgefallen. Diese Diskrepanz zu den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit lässt zwei mögliche Erklärungen zu. So könnten die eingeschlossenen Patienten mangelernährt gewesen sein oder die Unterschiede entstanden durch die unterschiedlichen Messmethoden. Letzteres erscheint wahrscheinlicher wenn man bedenkt, dass die Messungen bei Fella et al. mittels Immunturbidimetrie und in der vorliegenden Arbeit mittels ELISA erfolgten. Allein durch die unterschiedlichen Messmethoden könnten die Abweichungen schon begründet sein, zumal

nicht klar ist, welche Proteinformen, bzw. deren Verhältnis im Serum, die beiden Methoden erfassen. Zudem ist es als sehr unwahrscheinlich anzusehen, dass das verwendete Patientenkollektiv mit einer Stärke von 56 Patienten in seiner Gesamtheit mangelernährt war.

VI. Schlussfolgerungen

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass Serumproteine wie SAA und TTR als Biomarker für NZK eingesetzt werden können. Zwischen den einzelnen Subtypen konnten für jedes der beiden Proteine Konzentrationsunterschiede gemessen werden, wenngleich diese nicht signifikant waren. Zudem korreliert der Serumspiegel mit der Aggressivität der Tumoren. Die SAA-Konzentration im Serum zeigte einen positiven Zusammenhang mit dem Malignitätsgrad und der lokalen Tumorausbreitung. Für das TTR zeigte sich bezüglich des Malignitätsgrades ebenfalls solch ein Zusammenhang, während bei der lokalen Tumorausbreitung kein direkter Trend erkennbar war. Weiterhin konnte für die Serumkonzentrationen beider Proteine insbesondere bei papillären und klarzelligen NZK eine positive Korrelation mit deren Aggressivität festgestellt werden. Metastasierte Tumoren hatten signifikant höhere Werte als lokal begrenzte Tumoren. Der Metastasierungszeitpunkt hatte sowohl beim SAA als auch TTR keinen Einfluss auf die Serumkonzentration.

Durch die Kombination der beiden Proteine konnte die Aussagekraft bezüglich der metastasierten klarzelligen NZK gegenüber einer Einzelbetrachtung erhöht werden. Ob dies auch auf metastasierte Tumoren des papillären Subtyps zutrifft, bedarf weiterer prospektiver Studien mit großen Stichprobenumfängen.

Beide Proteine können nach Diagnose eines Nierentumors zur Einschätzung bezüglich des malignen Potentials bzw. nach erfolgter histologischer Klassifizierung zu einer Risikoabschätzung der Metastasierung eingesetzt werden. Es ist daher zu empfehlen, in weiteren prospektiven Untersuchungen die Kombination mit weiteren Proteinen zu erproben. Ziel könnte es sein, einen Algorithmus zu entwickeln, der eine differenzierte Betrachtung des individuellen Risikos der Patienten zulässt um somit weitere diagnostische und therapeutische Maßnahmen ergreifen zu können.

Desweiteren muss daran gearbeitet werden, ELISA zu entwickeln, die eine differenzierte Messung der Isoformen im Serum erlauben. Die aktuellen Tests erfassen SAA insgesamt, während in der SELDI-TOF MS insbesondere das SAA-1 und gegebenenfalls einige modifizierte Formen des SAA-1 bei NZK erhöht waren. Gleiches gilt für das TTR.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die SAA-Serumkonzentration unmittelbar nach Operation stark ansteigt und im Verlauf der ersten postoperativen Woche bereits wieder abfällt. In der weiteren Nachbeobachtung sank die Konzentration aber nicht unter den präoperativen Ausgangswert ab. Ferner fanden sich zu den beiden letzten

Nachsorgezeitpunkten wieder leicht erhöhte Konzentrationen, allerdings ohne signifikanten Unterschied. Aufgrund dieser Beobachtung und in Zusammenschau mit der Studienlage zu anderen Tumoren wie dem Kolonkarzinom erscheint es sinnvoll, in weiteren prospektiven Studien diese Fragestellung weiter zu erörtern, zumal vor allem die Rekrutierung von Patienten in der Nachsorge dabei intensiv erfolgen muss, um aussagekräftige Ergebnisse zu erzielen.

Für das Harnblasenkarzinom fanden sich keine signifikanten Veränderungen des SAA-Serumspiegels bezüglich der lokalen Tumorausbreitung oder des Malignitätsgrades. Auch gegenüber der Kontrollgruppe konnten keinerlei Veränderungen festgestellt werden. SAA steigt somit nicht ubiquitär bei Tumorerkrankungen an, sondern es bedarf spezifischer Stimuli, die in einer unterschiedlichen Tumorbilogie zu vermuten sind.

Sowohl für SAA als auch TTR zeigten sich nach Nierentransplantation signifikante Veränderungen gegenüber der Kontrollgruppe. Erhöhte SAA-Werte konnten auch bei einer auftretenden Abstoßungsreaktion gegenüber Patienten ohne Abstoßungsreaktion gemessen werden, weshalb SAA als Marker einer Abstoßungsreaktion eingesetzt werden kann. Beim TTR fanden sich keine signifikanten Unterschiede zwischen diesen beiden Gruppen.

Literaturverzeichnis

- Ang LC, Debowski T, Michalski R. 1991. Immunolocalization of prealbumin (transthyretin) in renal cell carcinoma. *Histopathology*, 18 (6):565-568.
- Atzpodien J, Schmitt E, Gertenbach U, Fornara P, Heynemann H, Maskow A, Ecke M, Woltjen HH, Jentsch H, Wieland W, Wandert T, Reitz M. 2005. Adjuvant treatment with interleukin-2- and interferon-alpha2a-based chemoimmunotherapy in renal cell carcinoma post tumour nephrectomy: results of a prospectively randomised trial of the German Cooperative Renal Carcinoma Chemoimmunotherapy Group (DGCIN). *Br J Cancer*, 92 (5):843-846.
- Batzler WU, Giersiepen K, Hentschel S, Husmann G, Kaatsch P, Katalinic A, Kieschke J, Kraywinkel K, Meyer M, Stabenow R, Stegmaier C, Bertz J, Haberland J, Wolf U. 2008. Krebs in Deutschland 2003 – 2004. Häufigkeiten und Trends
- Becker N, Holzmeier S. 2005. Die 20 häufigsten Krebstodesursachen im Jahr 2005
- Boeing H, Schlehofer B, Wahrendorf J. 1997. Diet, obesity and risk for renal cell carcinoma: results from a case control-study in Germany. *Z Ernährungswiss*, 36 (1):3-11.
- Brown JA, Takahashi S, Alcaraz A, Borell TJ, Anderl KL, Qian J, Persons DL, Bostwick DG, Lieber MM, Jenkins RB. 1996. Fluorescence in situ hybridization analysis of renal oncocytoma reveals frequent loss of chromosomes Y and 1. *J Urol*, 156 (1):31-35.
- Cano NJ. 2002. Metabolism and clinical interest of serum transthyretin (prealbumin) in dialysis patients. *Clin Chem Lab Med*, 40 (12):1313-1319.
- Chan DC, Chen CJ, Chu HC, Chang WK, Yu JC, Chen YJ, Wen LL, Huang SC, Ku CH, Liu YC, Chen JH. 2007. Evaluation of serum amyloid A as a biomarker for gastric cancer. *Ann Surg Oncol*, 14 (1):84-93.
- Chow WH, Gridley G, Fraumeni JF, Jr., Jarvholm B. 2000. Obesity, hypertension, and the risk of kidney cancer in men. *N Engl J Med*, 343 (18):1305-1311.
- Chow WH, McLaughlin JK, Mandel JS, Wacholder S, Niwa S, Fraumeni JF, Jr. 1996. Obesity and risk of renal cell cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 5 (1):17-21.
- Cohen AJ, Li FP, Berg S, Marchetto DJ, Tsai S, Jacobs SC, Brown RS. 1979. Hereditary renal-cell carcinoma associated with a chromosomal translocation. *N Engl J Med*, 301 (11):592-595.
- Coppin C, Porzsolt F, Awa A, Kumpf J, Coldman A, Wilt T. 2005. Immunotherapy for advanced renal cell cancer. *Cochrane Database Syst Rev*, (1):CD001425.

- Dai S, Wang X, Liu L, Liu J, Wu S, Huang L, Xiao X, He D. 2007. Discovery and identification of Serum Amyloid A protein elevated in lung cancer serum. *Sci China C Life Sci*, 50 (3):305-311.
- Denton MD, Magee CC, Ovuworie C, Mauiyyedi S, Pascual M, Colvin RB, Cosimi AB, Tolkoff-Rubin N. 2002. Prevalence of renal cell carcinoma in patients with ESRD pre-transplantation: a pathologic analysis. *Kidney Int*, 61 (6):2201-2209.
- Escher N, Kaatz M, Melle C, Hippler C, Ziemer M, Driesch D, Wollina U, von Eggeling F. 2007. Posttranslational modifications of transthyretin are serum markers in patients with mycosis fungoides. *Neoplasia*, 9 (3):254-259.
- Escudier B, Pluzanska A, Koralewski P, Ravaud A, Bracarda S, Szczylik C, Chevreau C, Filipek M, Melichar B, Bajetta E, Gorbunova V, Bay JO, Bodrogi I, Jagiello-Grusfeld A, Moore N. 2007a. Bevacizumab plus interferon alfa-2a for treatment of metastatic renal cell carcinoma: a randomised, double-blind phase III trial. *Lancet*, 370 (9605):2103-2111.
- Escudier B, Eisen T, Stadler WM, Szczylik C, Oudard S, Siebels M, Negrier S, Chevreau C, Solska E, Desai AA, Rolland F, Demkow T, Hutson TE, Gore M, Freeman S, Schwartz B, Shan M, Simantov R, Bukowski RM. 2007b. Sorafenib in advanced clear-cell renal-cell carcinoma. *N Engl J Med*, 356 (2):125-134.
- Farivar-Mohseni H, Perlmutter AE, Wilson S, Shingleton WB, Bigler SA, Fowler JE, Jr. 2006. Renal cell carcinoma and end stage renal disease. *J Urol*, 175 (6):2018-2020; discussion 2021.
- Fellah H, Omar S, Feki M, Abderrahim E, Ben Abdallah T, Massy ZA, Lacour B, Ben Maiz H, Kaabachi N, Mebazaa A. 2008. Is serum transthyretin a reliable marker of nutritional status in patients with end-stage renal disease? *Clin Biochem*, 41 (7-8):493-497.
- Figlin RA, Hutson TE, Michaelson MD, Bukowski RM, Kim ST, Chen I, Motzer RJ. 2008. Overall survival with sunitinib versus interferon alfa as first-line treatment in metastatic renal-cell carcinoma. *J Clin Oncol*, 26 (Abstr 5024)
- Findeisen P, Zapatka M, Peccerella T, Matzk H, Neumaier M, Schadendorf D, Ugurel S. 2009. Serum amyloid A as a prognostic marker in melanoma identified by proteomic profiling. *J Clin Oncol*, 27 (13):2199-2208.
- Firpo MA, Gay DZ, Granger SR, Scaife CL, DiSario JA, Boucher KM, Mulvihill SJ. 2009. Improved diagnosis of pancreatic adenocarcinoma using haptoglobin and serum amyloid A in a panel screen. *World J Surg*, 33 (4):716-722.

- Flanigan RC, Salmon SE, Blumenstein BA, Bearman SI, Roy V, McGrath PC, Caton JR, Jr., Munshi N, Crawford ED. 2001. Nephrectomy followed by interferon alfa-2b compared with interferon alfa-2b alone for metastatic renal-cell cancer. *N Engl J Med*, 345 (23):1655-1659.
- Friemel H. 1991. Immunologische Arbeitsmethoden. 4te Aufl. Jena: Urban & Fischer.
- Giordano TJ, Medeiros LJ, Monterroso V, Linehan WM, Merino MJ, 7. J-. 1996. Transthyretin (Prealbumin) Immunoreactivity in Renal Cell Carcinoma and Other Neoplasms. *International Journal of Surgical Pathology*, 4 (1):1-7.
- Glojnaric I, Casl MT, Simic D, Lukac J. 2001. Serum amyloid A protein (SAA) in colorectal carcinoma. *Clin Chem Lab Med*, 39 (2):129-133.
- Greving JP, Lee JE, Wolk A, Lukkien C, Lindblad P, Bergstrom A. 2007. Alcoholic beverages and risk of renal cell cancer. *Br J Cancer*, 97 (3):429-433.
- Gutfeld O, Prus D, Ackerman Z, Dishon S, Linke RP, Levin M, Urieli-Shoval S. 2006. Expression of serum amyloid A, in normal, dysplastic, and neoplastic human colonic mucosa: implication for a role in colonic tumorigenesis. *J Histochem Cytochem*, 54 (1):63-73.
- Hartmann A, Eide TC, Fauchald P, Bentdal O, Herbert J, Gallimore JR, Pepys MB. 1997. Serum amyloid A protein is a clinically useful indicator of acute renal allograft rejection. *Nephrol Dial Transplant*, 12 (1):161-166.
- Hu J, Mao Y, White K. 2003a. Overweight and obesity in adults and risk of renal cell carcinoma in Canada. *Soz Praventivmed*, 48 (3):178-185.
- Hu J, Mao Y, White K. 2003b. Diet and vitamin or mineral supplements and risk of renal cell carcinoma in Canada. *Cancer Causes Control*, 14 (8):705-714.
- Hudes G, Carducci M, Tomczak P, Dutcher J, Figlin R, Kapoor A, Staroslawska E, Sosman J, McDermott D, Bodrogi I, Kovacevic Z, Lesovoy V, Schmidt-Wolf IG, Barbarash O, Gokmen E, O'Toole T, Lustgarten S, Moore L, Motzer RJ. 2007. Temsirolimus, interferon alfa, or both for advanced renal-cell carcinoma. *N Engl J Med*, 356 (22):2271-2281.
- Hunt JD, van der Hel OL, McMillan GP, Boffetta P, Brennan P. 2005. Renal cell carcinoma in relation to cigarette smoking: meta-analysis of 24 studies. *Int J Cancer*, 114 (1):101-108.
- Ingenbleek Y, Young V. 1994. Transthyretin (prealbumin) in health and disease: nutritional implications. *Annu Rev Nutr*, 14:495-533.

- Jacobsson B, Lignelid H, Bergerheim US. 1995. Transthyretin and cystatin C are catabolized in proximal tubular epithelial cells and the proteins are not useful as markers for renal cell carcinomas. *Histopathology*, 26 (6):559-564.
- Junker K, von Eggeling F, Muller J, Steiner T, Schubert J. 2006. [Identification of biomarkers and therapeutic targets for renal cell cancer using ProteinChip technology]. *Urologe A*, 45 (3):305-306, 308, 310-312 passim.
- Junker K, Weirich G, Amin MB, Moravek P, Hindermann W, Schubert J. 2003. Genetic subtyping of renal cell carcinoma by comparative genomic hybridization. *Recent Results Cancer Res*, 162:169-175.
- Junker K, Moravek P, Podhola M, Weirich G, Hindermann W, Janitzky V, Schubert J. 2000. Genetic alterations in metastatic renal cell carcinoma detected by comparative genomic hybridization: correlation with clinical and histological data. *Int J Oncol*, 17 (5):903-908.
- Junker K, Weirich G, Moravek P, Podhola M, Ilse B, Hartmann A, Schubert J. 2001. Familial and sporadic renal oncocytomas--a comparative molecular-genetic analysis. *Eur Urol*, 40 (3):330-336.
- Junker K, Steiner T, Sanjmyatav J, Pilchowski R, Heinze C, Walter M, Schubert J. 2009. [Tumor profiling of renal cell tumors: relevance for diagnostics and therapy]. *Pathologe*, 30 (2):105-110.
- Kojima Y, Takahara S, Miyake O, Nonomura N, Morimoto A, Mori H. 2006. Renal cell carcinoma in dialysis patients: a single center experience. *Int J Urol*, 13 (8):1045-1048.
- Kovacs G. 1993. Molecular cytogenetics of renal cell tumors. *Adv Cancer Res*, 62:89-124.
- Kovacs G, Akhtar M, Beckwith BJ, Bugert P, Cooper CS, Delahunt B, Eble JN, Fleming S, Ljungberg B, Medeiros LJ, Moch H, Reuter VE, Ritz E, Roos G, Schmidt D, Srigley JR, Storkel S, van den Berg E, Zbar B. 1997. The Heidelberg classification of renal cell tumours. *J Pathol*, 183 (2):131-133.
- Kozak KR, Su F, Whitelegge JP, Faull K, Reddy S, Farias-Eisner R. 2005. Characterization of serum biomarkers for detection of early stage ovarian cancer. *Proteomics*, 5 (17):4589-4596.
- Kuczyk M, Munch T, Machtens S, Bokemeyer C, Wefer A, Hartmann J, Kollmannsberger C, Kondo M, Jonas U. 2002. The need for routine adrenalectomy during surgical treatment for renal cell cancer: the Hannover experience. *BJU Int*, 89 (6):517-522.

- Le L, Chi K, Tyldesley S, Flibotte S, Diamond DL, Kuzyk MA, Sadar MD. 2005. Identification of serum amyloid A as a biomarker to distinguish prostate cancer patients with bone lesions. *Clin Chem*, 51 (4):695-707.
- Lindblad P, Wolk A, Bergstrom R, Persson I, Adami HO. 1994. The role of obesity and weight fluctuations in the etiology of renal cell cancer: a population-based case-control study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 3 (8):631-639.
- Liu DH, Wang XM, Zhang LJ, Dai SW, Liu LY, Liu JF, Wu SS, Yang SY, Fu S, Xiao XY, He DC. 2007a. Serum amyloid A protein: a potential biomarker correlated with clinical stage of lung cancer. *Biomed Environ Sci*, 20 (1):33-40.
- Liu L, Liu J, Dai S, Wang X, Wu S, Wang J, Huang L, Xiao X, He D. 2007b. Reduced transthyretin expression in sera of lung cancer. *Cancer Sci*, 98 (10):1617-1624.
- Ljungberg B, Hanbury DC, Kuczyk MA, Merseburger AS, Mulders PF, Patard JJ, Sinescu IC. 2007. Renal cell carcinoma guideline. *Eur Urol*, 51 (6):1502-1510.
- Maclure M, Willett W. 1990. A case-control study of diet and risk of renal adenocarcinoma. *Epidemiology*, 1 (6):430-440.
- Maher ER, Yates JR. 1991. Familial renal cell carcinoma: clinical and molecular genetic aspects. *Br J Cancer*, 63 (2):176-179.
- Malle E, Sodin-Semrl S, Kovacevic A. 2009. Serum amyloid A: an acute-phase protein involved in tumour pathogenesis. *Cell Mol Life Sci*, 66 (1):9-26.
- McDermott DF, Regan MM, Clark JI, Flaherty LE, Weiss GR, Logan TF, Kirkwood JM, Gordon MS, Sosman JA, Ernstoff MS, Tretter CP, Urba WJ, Smith JW, Margolin KA, Mier JW, Gollob JA, Dutcher JP, Atkins MB. 2005. Randomized phase III trial of high-dose interleukin-2 versus subcutaneous interleukin-2 and interferon in patients with metastatic renal cell carcinoma. *J Clin Oncol*, 23 (1):133-141.
- McLaughlin JK, Hrubec Z, Heineman EF, Blot WJ, Fraumeni JF, Jr. 1990. Renal cancer and cigarette smoking in a 26-year followup of U.S. veterans. *Public Health Rep*, 105 (5):535-537.
- Michaeli A, Finci-Yeheskel Z, Dishon S, Linke RP, Levin M, Urieli-Shoval S. 2008. Serum amyloid A enhances plasminogen activation: implication for a role in colon cancer. *Biochem Biophys Res Commun*, 368 (2):368-373.
- Mickisch GH, Garin A, van Poppel H, de Prijck L, Sylvester R. 2001. Radical nephrectomy plus interferon-alfa-based immunotherapy compared with interferon alfa alone in metastatic renal-cell carcinoma: a randomised trial. *Lancet*, 358 (9286):966-970.

- Moore LE, Fung ET, McGuire M, Rabkin CC, Molinaro A, Wang Z, Zhang F, Wang J, Yip C, Meng XY, Pfeiffer RM. 2006. Evaluation of apolipoprotein A1 and posttranslationally modified forms of transthyretin as biomarkers for ovarian cancer detection in an independent study population. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 15 (9):1641-1646.
- Motzer RJ, Mazumdar M, Bacik J, Berg W, Amsterdam A, Ferrara J. 1999. Survival and prognostic stratification of 670 patients with advanced renal cell carcinoma. *J Clin Oncol*, 17 (8):2530-2540.
- Motzer RJ, Hutson TE, Tomczak P, Michaelson MD, Bukowski RM, Rixe O, Oudard S, Negrier S, Szczylik C, Kim ST, Chen I, Bycott PW, Baum CM, Figlin RA. 2007. Sunitinib versus interferon alfa in metastatic renal-cell carcinoma. *N Engl J Med*, 356 (2):115-124.
- Motzer RJ, Escudier B, Oudard S, Hutson TE, Porta C, Bracarda S, Grunwald V, Thompson JA, Figlin RA, Hollaender N, Urbanowitz G, Berg WJ, Kay A, Lebwohl D, Ravaud A. 2008. Efficacy of everolimus in advanced renal cell carcinoma: a double-blind, randomised, placebo-controlled phase III trial. *Lancet*, 372 (9637):449-456.
- Nakayama T, Sonoda S, Urano T, Yamada T, Okada M. 1993. Monitoring both serum amyloid protein A and C-reactive protein as inflammatory markers in infectious diseases. *Clin Chem*, 39 (2):293-297.
- Neumann HP, Bender BU, Berger DP, Laubenberger J, Schultze-Seemann W, Wetterauer U, Ferstl FJ, Herbst EW, Schwarzkopf G, Hes FJ, Lips CJ, Lamiell JM, Masek O, Riegler P, Mueller B, Glavac D, Brauch H. 1998. Prevalence, morphology and biology of renal cell carcinoma in von Hippel-Lindau disease compared to sporadic renal cell carcinoma. *J Urol*, 160 (4):1248-1254.
- Pantuck AJ, Zeng G, Belldegrun AS, Figlin RA. 2003. Pathobiology, prognosis, and targeted therapy for renal cell carcinoma: exploiting the hypoxia-induced pathway. *Clin Cancer Res*, 9 (13):4641-4652.
- Paret C, Schon Z, Szponar A, Kovacs G. 2009. Inflammatory Protein Serum Amyloid A1 Marks a Subset of Conventional Renal Cell Carcinomas with Fatal Outcome. *Eur Urol*,
- Parker AS, Cerhan JR, Lynch CF, Ershow AG, Cantor KP. 2002. Gender, alcohol consumption, and renal cell carcinoma. *Am J Epidemiol*, 155 (5):455-462.
- Parker AS, Cerhan JR, Janney CA, Lynch CF, Cantor KP. 2003. Smoking cessation and renal cell carcinoma. *Ann Epidemiol*, 13 (4):245-251.

- Parker AS, Cerhan JR, Lynch CF, Leibovich BC, Cantor KP. 2004. History of urinary tract infection and risk of renal cell carcinoma. *Am J Epidemiol*, 159 (1):42-48.
- Patel PH, Chadalavada RS, Chaganti RS, Motzer RJ. 2006. Targeting von Hippel-Lindau pathway in renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res*, 12 (24):7215-7220.
- Pathak S, Strong LC, Ferrell RE, Trindade A. 1982. Familial renal cell carcinoma with a 3;11 chromosome translocation limited to tumor cells. *Science*, 217 (4563):939-941.
- Presti JC, Jr., Moch H, Reuter VE, Huynh D, Waldman FM. 1996. Comparative genomic hybridization for genetic analysis of renal oncocytomas. *Genes Chromosomes Cancer*, 17 (4):199-204.
- Ramankulov A, Lein M, Johannsen M, Schrader M, Miller K, Loening SA, Jung K. 2008. Serum amyloid A as indicator of distant metastases but not as early tumor marker in patients with renal cell carcinoma. *Cancer Lett*, 269 (1):85-92.
- Robson CJ, Churchill BM, Anderson W. 2002. The results of radical nephrectomy for renal cell carcinoma. 1969. *J Urol*, 167 (2 Pt 2):873-875; discussion 876-877.
- Schmelz HU, Sparwasser C, Weidner W. 2006. *Facharztwissen Urologie*. 1.te Aufl. Berlin: Springer.
- Schmidt L, Duh FM, Chen F, Kishida T, Glenn G, Choyke P, Scherer SW, Zhuang Z, Lubensky I, Dean M, Allikmets R, Chidambaram A, Bergerheim UR, Feltis JT, Casadevall C, Zamarron A, Bernues M, Richard S, Lips CJ, Walther MM, Tsui LC, Geil L, Orcutt ML, Stackhouse T, Lipan J, Slife L, Brauch H, Decker J, Niehans G, Hughson MD, Moch H, Storkel S, Lerman MI, Linehan WM, Zbar B. 1997. Germline and somatic mutations in the tyrosine kinase domain of the MET proto-oncogene in papillary renal carcinomas. *Nat Genet*, 16 (1):68-73.
- Schwerdtle RF, Storkel S, Neuhaus C, Brauch H, Weidt E, Brenner W, Hohenfellner R, Huber C, Decker HJ. 1996. Allelic losses at chromosomes 1p, 2p, 6p, 10p, 13q, 17p, and 21q significantly correlate with the chromophobe subtype of renal cell carcinoma. *Cancer Res*, 56 (13):2927-2930.
- Shuch B, Lam JS, Belldegrun AS. 2006. Open partial nephrectomy for the treatment of renal cell carcinoma. *Curr Urol Rep*, 7 (1):31-38.
- Speicher MR, Schoell B, du Manoir S, Schrock E, Ried T, Cremer T, Storkel S, Kovacs A, Kovacs G. 1994. Specific loss of chromosomes 1, 2, 6, 10, 13, 17, and 21 in chromophobe renal cell carcinomas revealed by comparative genomic hybridization. *Am J Pathol*, 145 (2):356-364.

- Storkel S. 1999. Epithelial tumors of the kidney. Pathological subtyping and cytogenetic correlation. *Urologe A*, 38 (5):425-432.
- Urieli-Shoval S, Linke RP, Matzner Y. 2000. Expression and function of serum amyloid A, a major acute-phase protein, in normal and disease states. *Curr Opin Hematol*, 7 (1):64-69.
- Urieli-Shoval S, Cohen P, Eisenberg S, Matzner Y. 1998. Widespread expression of serum amyloid A in histologically normal human tissues. Predominant localization to the epithelium. *J Histochem Cytochem*, 46 (12):1377-1384.
- van Dijk BA, Schouten LJ, Kiemeny LA, Goldbohm RA, van den Brandt PA. 2005. Vegetable and fruit consumption and risk of renal cell carcinoma: results from the Netherlands cohort study. *Int J Cancer*, 117 (4):648-654.
- Wang N, Perkins KL. 1984. Involvement of band 3p14 in t(3;8) hereditary renal carcinoma. *Cancer Genet Cytogenet*, 11 (4):479-481.
- Weirich G, Glenn G, Junker K, Merino M, Storkel S, Lubensky I, Choyke P, Pack S, Amin M, Walther MM, Linehan WM, Zbar B. 1998. Familial renal oncocytoma: clinicopathological study of 5 families. *J Urol*, 160 (2):335-340.
- Zbar B, Glenn G, Lubensky I, Choyke P, Walther MM, Magnusson G, Bergerheim US, Pettersson S, Amin M, Hurley K. 1995. Hereditary papillary renal cell carcinoma: clinical studies in 10 families. *J Urol*, 153 (3 Pt 2):907-912.
- Zhang Z, Bast RC, Jr., Yu Y, Li J, Sokoll LJ, Rai AJ, Rosenzweig JM, Cameron B, Wang YY, Meng XY, Berchuck A, Van Haaften-Day C, Hacker NF, de Bruijn HW, van der Zee AG, Jacobs IJ, Fung ET, Chan DW. 2004. Three biomarkers identified from serum proteomic analysis for the detection of early stage ovarian cancer. *Cancer Res*, 64 (16):5882-5890.

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: PD Dr. med. K. Junker,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Ort, Datum

Unterschrift des Verfassers